

Dynorphin, Rimorphin und  
 $\alpha$ -Neo-Endorphin-Charakterisierung  
eines neuen endogenen  
Opioid-Peptid-Systems

Bernd Seizinger

Duss München  
1984







Aus der Abteilung für Neuropharmakologie  
des Max-Planck-Instituts für Psychiatrie  
in München

Direktor: Prof. Dr. Albert Herz

DYNORPHIN, RIMORPHIN und  $\alpha$ -NEO-ENDORPHIN -  
CHARAKTERISIERUNG EINES NEUEN ENDOGENEN  
OPIOID-PEPTID-SYSTEMS

Inaugural-Dissertation zur  
Erlangung der Doktorwürde  
in der gesamten Medizin  
an der  
Ludwig-Maximilians-Universität

vorgelegt von  
Bernd Seizinger

München

1983

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. W. Forth

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 13.03.1984

Diese Arbeit widme ich meinen  
Eltern für ihre Geduld und  
Unterstützung.



INHALTSVERZEICHNIS

|                                                                          | Seite |
|--------------------------------------------------------------------------|-------|
| 1. EINLEITUNG                                                            | 1     |
| 2. METHODEN                                                              | 9     |
| 2.1 Tierexperimente                                                      | 9     |
| 2.2 Teilung und Extraktion von Geweben                                   | 9     |
| 2.3 Radioimmunologische Bestimmungen                                     | 10    |
| 2.3.1 Herstellung der Antiseren                                          | 10    |
| 2.3.2 Jodierung der Peptide                                              | 11    |
| 2.3.2 Protokoll des Radioimmunoassays                                    | 12    |
| 2.3.4 Charakterisierung der Antiseren                                    | 12    |
| 2.4 Immunpräzipitation                                                   | 14    |
| 2.5 Chromatographische Verfahren                                         | 16    |
| 2.5.1 Gelchromatographie                                                 | 16    |
| 2.5.2 Hochdrucksflüssigkeitschromatographie (HPLC)                       | 16    |
| 2.6 Enzymatische Methoden                                                | 17    |
| 2.7 In vitro Freisetzung aus isolierten Hypophysen                       | 17    |
| 2.8 Plexus-myentericus-Längsmuskel-Präparat des Meerschweinchendünndarms | 18    |
| 3. MATERIALIEN                                                           | 19    |
| 3.1 Tiere                                                                | 19    |
| 3.2 Peptide und Pharmaka                                                 | 19    |
| 3.3 Enzyme                                                               | 19    |
| 3.4 Immunchemikalien                                                     | 19    |

|                                                                                                                                                                 | Seite |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| 3.5 Radioaktive Substanzen                                                                                                                                      | 19    |
| 3.6 Sonstige Materialien                                                                                                                                        | 20    |
| 4. ERGEBNISSE                                                                                                                                                   | 21    |
| 4.1 Charakterisierung, Identifizierung und regionale Verteilung von Proenkephalin B-Peptiden in Hypophyse, Zentralnervensystem und peripheren Organen der Ratte | 21    |
| 4.1.1 DYNORPHIN-immunoreaktive Komponenten                                                                                                                      | 21    |
| 4.1.2 RIMORPHIN-immunoreaktive Komponenten                                                                                                                      | 35    |
| 4.1.3 $\alpha$ - und $\beta$ -NEO-ENDORPHIN                                                                                                                     | 38    |
| 4.2 Modulation von hypophysärem DYNORPHIN und $\alpha$ -NEO-ENDORPHIN im Vergleich zu anderen (Opioid-) Peptiden                                                | 41    |
| 4.2.1 In vitro Freisetzung aus isolierten Hypophysenmittelhinterlappen                                                                                          | 41    |
| 4.2.2 Effekte von Dehydratation, Dexamethasonbehandlung und Adrenalectomie                                                                                      | 43    |
| 4.2.3 Opioid-Peptide in Brattleboro-Ratten                                                                                                                      | 47    |
| 5. DISKUSSION                                                                                                                                                   | 49    |
| 5.1 Die regionale Verteilung des Proenkephalin B-Systems im Vergleich zu anderen Opioid-Peptid-Systemen                                                         | 49    |
| 5.2 Charakterisierung, Identifizierung und mögliche Bedeutung verschiedener Opioid-Peptide des Proenkephalin B-Systems                                          | 50    |
| 5.2.1 DYNORPHIN <sub>1-17</sub> und Vorläuferpeptide                                                                                                            | 51    |
| 5.2.2 DYNORPHIN <sub>1-8</sub> - ein neues endogenes Opioid-Peptid                                                                                              | 51    |
| 5.2.3 Die Bedeutung der $\alpha$ -N-Acetylierung                                                                                                                | 52    |
| 5.2.4 RIMORPHIN                                                                                                                                                 | 53    |

|                                                                                                                       | Seite |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| 5.2.5 Die Sonderstellung des Hypophysen-<br>vorderlappens                                                             | 54    |
| 5.2.6 $\alpha$ -NEO-ENDORPHIN und $\beta$ -NEO-ENDORPHIN                                                              | 55    |
| 5.3 Die Bedeutung der selektiven enzymatischen<br>Spaltung von Proenkephalin B                                        | 56    |
| 5.4 Regulation und mögliche physiologische<br>Bedeutung von DYNORPHIN und $\alpha$ -NEO-ENDORPHIN<br>in der Hypophyse | 61    |
| 5.5 Weitere mögliche physiologische Funktionen<br>von Opioid-Peptiden des Proenkephalin B-<br>Systems                 | 66    |
| 6. ZUSAMMENFASSUNG                                                                                                    | 70    |
| 7. LITERATURVERZEICHNIS                                                                                               | 72    |



Abkürzungen:

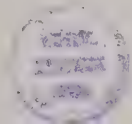
|      |                                      |
|------|--------------------------------------|
| ir-  | immunoreaktiv                        |
| RIA  | Radioimmunoassay                     |
| HPLC | Hochdruckflüssigkeitschromatographie |



## 1. EINLEITUNG

Zwei Jahre nach der Entdeckung der Opiatrezeptoren (Pert und Snyder, 1973; Simon et al., 1973; Terenius, 1973) gelang es Hughes und Kosterlitz im Jahre 1975, zwei Pentapeptide mit opiatartiger Wirkung, Met-Enkephalin (Tyr-Gly-Gly-Phe-Met) und Leu-Enkephalin (Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu) aus Schweinehirnen zu isolieren (Hughes et al., 1975). Kurz danach entdeckte man in der Hypophyse weitere opiatartige Peptide, die in der Sequenz eines schon seit 1965 bekannten Hypophysenhormons, des  $\beta$ -Lipotropins (Li et al., 1965) enthalten waren, nämlich  $\beta$ -Endorphin, sowie eine Reihe von am C-Terminus verkürzten Fragmenten von  $\beta$ -Endorphin (Bradbury et al., 1976; Guillemin et al., 1976; Ling et al., 1976). Obwohl Met-Enkephalin in der Sequenz von  $\beta$ -Endorphin enthalten war, mehrten sich Befunde, die deutlich werden ließen, daß das Pentapeptid physiologischerweise höchstwahrscheinlich nicht aus  $\beta$ -Endorphin freigesetzt wird (Mains et al., 1977; Mains und Eipper, 1979; Bloom et al., 1978; Rossier et al., 1977; Duka et al., 1978; Gramsch et al., 1980; Watson et al., 1978). Darüber hinaus konnten in den letzten Jahren eine Reihe weiterer Opioid-Peptide (v.a. aus dem Nebennierenmark) isoliert werden, die alle Met-Enkephalin am N-Terminus enthalten, aber offensichtlich nicht von  $\beta$ -Endorphin abstammen können (Stein et al., 1979; Mizuno et al., 1980a,b; zur Übersicht: Rossier, 1981).

1979 gelang es Goldstein und Mitarbeiter, ein neues Opioid-Peptid aus Schweinehypophysen zu extrahieren, das die Sequenz von Leu-Enkephalin am N-Terminus enthält (Goldstein et al., 1979). Aufgrund seiner extrem hohen opiatartigen Wirkung wurde es Dynorphin genannt, abgeleitet vom griechischen "dýnamis" = die Stärke. Am Längsmuskel des Meerschweinchendünndarms, einem "klassischen" Präparat zur Testung von Opiaten und Opioid-peptiden, zeigt Dynorphin eine mehr als 700-fach höhere Wirkung als Leu-Enkephalin.



Zunächst konnten nur die 13 N-terminalen Aminosäuren von Dynorphin (Dynorphin<sub>1-13</sub>) sequenziert werden (Goldstein et al., 1979), erst etwa zwei Jahre später wurde die komplette Sequenz des Heptadecapeptids (Dynorphin<sub>1-17</sub>) bekannt (Goldstein et al., 1981; Tachibana et al., 1982) (siehe Abb. 1).

|                           |                                                                         |
|---------------------------|-------------------------------------------------------------------------|
| Leu-Enkephalin            | Tyr-Gly-Gly-Phe- Leu                                                    |
| Dynorphin <sub>1-17</sub> | Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg-Ile-Arg-<br>Pro-Lys-Leu-Lys-Trp-Asp-Asn-Gln |
| Dynorphin <sub>1-8</sub>  | Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg-Ile                                         |
| Rimorphin                 | Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg-Gln-Phe-<br>Lys-Val-Val-Thr                 |
| $\alpha$ -NEO-Endorphin   | Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Lys-Tyr-Pro-Lys                                 |
| $\beta$ -Neo-Endorphin    | Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Lys-Tyr-Pro                                     |

Abb. 1

Aminosäuresequenzen von Opioid-Peptiden mit Leu-Enkephalin-Sequenz. (Für Referenzen siehe Einleitung.)

Parallel dazu gelang die Strukturaufklärung von weiteren Leu-Enkephalin-enthaltenden Opioid-Peptiden, von Dynorphin<sub>1-8</sub>, dem N-terminalen Oktapeptid von Dynorphin<sub>1-17</sub> (Minamino et al., 1980; Seizinger et al., 1981b), von  $\alpha$ -Neo-Endorphin (Kangawa et al., 1981) und  $\beta$ -Neo-Endorphin (=  $\alpha$ -Neo-Endorphin<sub>1-9</sub>) (Minamino et al., 1981), sowie vor kurzem von Rimorphin (Kilpatrick et al., 1982). ("Dynorphin<sub>1-17</sub>" wird bisweilen auch als "Dynorphin A", sowie "Rimorphin" als "Dynorphin B" bezeichnet.) Die Sequenzen dieser Opioid-Peptide sind in Abb. 1 dargestellt. Allen diesen Leu-Enkephalin-enthaltenden Opioid-Peptiden ist gemeinsam, daß sie in praktisch allen biologischen Testsystemen für

Opiate (z.B. Analgesietests, Längsmuskelpräparat des Meer-schweinchendünndarms, etc.) z.T. sogar erheblich aktiver sind als Leu-Enkephalin selbst. Daher ist es äußerst unwahrscheinlich, daß es sich bei diesen "großen LEU-Enkephalinen" um bloße Vorläuferstufen oder Speicherformen von Leu-Enkephalin handelt. Vielmehr scheinen sie selbst wichtige Opioid-Peptide darzustellen.

Die Frage nach der Zuordnung der verwirrenden Vielzahl an verschiedenen Opioid-Peptiden zu bestimmten großmolekularen Vorläuferpeptiden wurde lange Zeit kontrovers diskutiert. Selbst die Frage nach einer möglichen Zusammengehörigkeit von Met-Enkephalin und Leu-Enkephalin blieb bis vor kurzem umstritten. So wurden einerseits Met-Enkephalin und Leu-Enkephalin immunohistochemisch in verschiedenen Zellen des Rattenhirns gefunden (Larssen et al., 1979), während andererseits sogar ein Peptid aus Rindernebennierenmark isoliert werden konnte, das sowohl Met-Enkephalin als auch Leu-Enkephalin in seiner Sequenz enthielt (Kilpatrick et al., 1981).

Mit Hilfe von molekularem Klonieren und DNA-Sequenzierungstechniken gelang es schließlich in jüngster Zeit, alle bisher bekannten endogenen Opioid-Peptide in den Sequenzen von drei verschiedenen Opioid-Peptid-Vorläufermolekülen nachzuweisen (Nakanishi et al., 1979; Comb et al., 1981; Noda et al., 1981; Gubler et al., 1981; Kakidani et al., 1982).

Dazu zunächst einige allgemeine Vorbemerkungen über das Prinzip der Synthese von Peptiden via Vorläufermolekülen. Wie an einer Reihe von Peptiden aufgeklärt, erfolgt zunächst an den Ribosomen die Biosynthese eines sogenannten "prä-pro-Peptides" mit einem Molekulargewicht von meist 20.000 bis 30.000, das die Sequenz des Peptids enthält (Yoo et al., 1982; Jacobs et al., 1981; Lund et al., 1982). Dieses "prä-pro-Peptid" besitzt am N-Terminus noch ein

sogenanntes "Signal-Peptid", hauptsächlich aus hydrophoben Aminosäuren bestehend. Das "Signal-Peptid" ist für den Transport des Vorläufermoleküls durch die Membranen des endoplasmatischen Reticulums notwendig; nach der Abspaltung des "Signal-Peptids" entsteht das sog. "pro-Peptid". Dieses biologisch noch inaktive "pro-Peptid", der sog. "Precursor", wird nun post-translational, also nach erfolgter Biosynthese an den Ribosomen, im Golgi-Apparat oder in den Vesikeln weiter enzymatisch in das biologisch aktive Endprodukt (oder biologisch aktiven -Produkte) gespalten. Man nennt diesen Vorgang auch "Processing".

Es gibt dabei innerhalb der Vorläufermoleküle bestimmte Sequenzen, an denen dieses Processing bevorzugt erfolgt. Die "klassische" Spaltungssequenz ist die Aufeinanderfolge zweier basischer Aminosäuren (vor allem die Sequenz Lysin-Arginin (Lys-Arg)); die biologisch aktiven Peptide innerhalb der Vorläuferpeptidsequenzen sind meist zu beiden Seiten von solchen Sequenzen flankiert, z.B.  $[H_2N-x-Lys-Arg-PEPTID-Lys-Arg-x-COOH]$  (Steiner et al., 1980; Yoo et al., 1982; Jacobs et al., 1981; Lund et al., 1982; Furutani et al., 1983). Die Freisetzung der biologisch aktiven Sequenzen erfolgt hierbei durch Aufeinanderfolge von Trypsin- und Carboxypeptidase B-artigen Enzymen: Trypsin-artige Enzyme spalten zunächst am C-Terminus basischer Aminosäuren, es entsteht also im obigen Beispiel [-Peptide-Lys-]. Mit Hilfe von Carboxypeptidase B-artigen Enzymen, die selektiv basische Aminosäuren vom C-Terminus von Peptiden abspalten, entsteht schließlich das biologisch aktive Endprodukt.

Dieses Spaltungsprinzip konnte auch für Opioid-Peptide zunächst durch die komplette Strukturaufklärung von Proopiomelanocortin, dem gemeinsamen Vorläuferpeptid für  $\beta$ -Endorphin und Adrenocorticotropes Hormon (ACTH) (Mains et al., 1977), durch Nakanishi und Mitarbeiter bestätigt werden (Nakanishi et al., 1979). Zwei Jahre später, 1981, wurde die komplette Sequenz eines weiteren Opioid-Peptid Vorläu-

fermoleküls bekannt. Das als "Proenkephalin A" bezeichnete Peptid enthält sechsmal die Sequenz von Met-Enkephalin und eine Leu-Enkephalin-Sequenz, die jeweils zu beiden Seiten von 2 basischen Aminosäuren flankiert sind (Noda et al., 1981; Gubler et al., 1981; Comb et al., 1981). Darin enthalten sind alle bisher bekannten "großen Met-Enkephaline" (außer das in Proopiomelanocortin enthaltene  $\beta$ -Endorphin und seine Fragmente). Jedoch enthält Proenkephalin A überraschenderweise weder die Sequenz von Dynorphin, noch die von  $\alpha/\beta$ -Neo-Endorphin, ebensowenig wie (das 1981 noch nicht bekannte) Rimorphin.

Die Sequenzen dieser "großen Leu-Enkephaline", des Dynorphin, des  $\alpha/\beta$ -Neo-Endorphin und des Rimorphin, fanden sich schließlich alle in der Struktur eines erst vor kurzem sequenzierten dritten Opioid-Peptid-Vorläufermoleküls, des sog. "Proenkephalin B" (Kakidani et al., 1982). Diese Opioid-Peptide gehören also gemeinsam einem neuen (dritten) Opioid-Peptid-System an. Die Anordnung der verschiedenen Opioid-Peptide im C-terminalen Teil des Precursors ist schematisch in Abb. 2 dargestellt. Alle Opioid-Peptide sind innerhalb der C-terminalen 85 Aminosäuren des etwa 250 Aminosäuren umfassenden Precursors enthalten. Sequenzen mit 2 basischen Aminosäuren sind gekennzeichnet, sie fassen u.a. jeweils die 3 Leu-Enkephalin-Sequenzen des Precursors ein. Proenkephalin B besitzt also, ähnlich wie Proenkephalin A und auch Proopiomelanocortin, repetitive, d.h. sich wiederholende Sequenzen.

Die vorliegenden Untersuchungen beschäftigen sich mit der Charakterisierung dieses neuen (dritten) Opioid-Peptid-Systems: mit der Identifizierung, regionalen Verteilung, Regulation und möglichen biologischen Funktion seiner verschiedenen Opioid-Peptid-Formen im Zentralnervensystem, in der Hypophyse und in peripheren Organen der Ratte. Der Großteil dieser Untersuchungen war bei Bekanntwerden von Proenkephalin B bereits abgeschlossen; die Aufklärung der

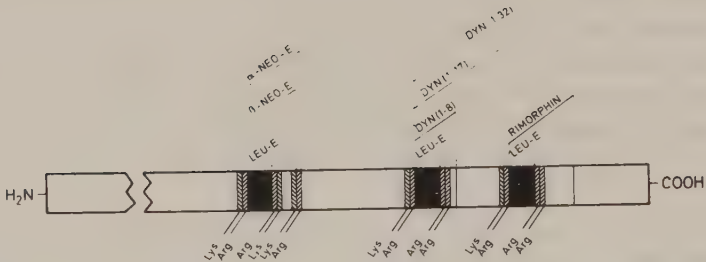


Abb. 2

Schematische Darstellung des C-terminalen Teils von Proenkephalin B (nach Kakidani et al., 1982). Proenkephalin B ist das gemeinsame Vorläufermolekül der Opioid-Peptide  $\alpha$ -Neo-Endorphin ( $\alpha$ -NEO-E), Dynorphin (DYN) und Rimorphin. Der Precursor besitzt 3 Leu-Enkephalin (Leu-E)-Sequenzen. Sequenzen mit 2 basischen Aminosäuren (Lys = Lysin; Arg = Arginin) sind eingezeichnet.

Sequenz von Proenkephalin B wirft daher neues Licht auf die vorliegenden Ergebnisse und bestätigt einige darin formulierte Thesen. Darüber hinaus gibt die vorliegende Untersuchung am Beispiel des Proenkephalin B neue Einblicke in das post-translationale Processing von Vorläufermolekülen. Dabei wird deutlich, daß sich aus der alleinigen Kenntnis der Sequenz eines Vorläufermoleküls dessen post-translationale Spaltung und damit die (biologisch aktiven) Endprodukte dieses Processings nicht vorhersagen lassen. Wie am Beispiel des Proenkephalin B-Precursors erläutert werden wird, existieren neben den "typischen" Spaltungssequenzen

an Stellen mit zwei basischen Aminosäuren noch andere (zusätzlich oder alternative) Spaltungssignale. Darüber hinaus wird gezeigt, daß das Processing von Proenkephalin B, je nach enzymatischer Ausstattung der einzelnen Gewebe, in unterschiedlichen Geweben unterschiedlich verläuft und somit zur Bildung jeweils verschiedener Opioid-Peptide mit möglicherweise unterschiedlichen biologischen Funktionen führt.

Nachdem ein Peptid aus seinem Vorläufermolekül freigesetzt ist, kann es zusätzlich an seinem N- oder C-Terminus modifiziert werden, was häufig für die biologische Aktivität des Peptides bedeutsam ist. Wie vor kurzem gezeigt wurde, können die Opioid-Peptide  $\beta$ -Endorphin, Leu-Enkephalin und Met-Enkephalin am N-Terminus  $\alpha$ -N-acetyliert werden, wodurch sie ihre gesamten Opiateigenschaften verlieren, weil sie nicht mehr an Opiatrezeptoren binden (Smyth et al., 1979; Seizinger und Höllt, 1980, 1982; Seizinger et al., 1981; Eipper und Mains, 1981; Seizinger, in Vorbereitung). Die vorliegende Arbeit untersucht daher die neuen Opioid-Peptide des Proenkephalin B-Systems auf mögliche  $\alpha$ -N-Acetylierung.

Immunohistochemisch wurden Dynorphin und  $\alpha$ -Neo-Endorphin besonders reichhaltig in Nervenfasern gefunden, die von magnozellulären Neuronen des Hypothalamus aus in den Hypophysenhinterlappen projizieren (Watson et al., 1981; Weber et al., 1982a). Dabei sind Dynorphin und  $\alpha$ -Neo-Endorphin in denselben Zellen wie das neurosekretorische Hormon Vasopressin lokalisiert (Watson et al., 1982). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, daß Opiate und Opioid-Peptide die Freisetzung von Vasopressin aus dem Hypophysenhinterlappen beeinflussen können (Rossier et al., 1979; Iversen et al., 1980; Lightman et al., 1982). Um Einblicke in mögliche physiologische Funktionen von Opioid-Peptiden des Proenkephalin B-Systems zu gewinnen, war es von besonderem Interesse, die Regulation der Freisetzung dieser Peptide im

Vergleich zu Vasopressin und auch im Vergleich zu anderen Opioid-Peptiden der Hypophyse zu untersuchen; dies ist im 2. Abschnitt dieser Studie dargestellt.

## 2. METHODEN

### 2.1. Tierexperimente

Als Versuchstiere dienten männliche Sprague-Dawley-Ratten (200-250 g). Zusätzlich wurden in einem Teil der Experimente männliche Brattleboro-Ratten (160-190 g) verwendet. Homozygote Brattleboro-Ratten besitzen einen hereditären zentralen Diabetes insipidus; sie sind somit unfähig zur Synthese des neurosekretorischen Hormons Vasopressin. Als Kontrollen dienten gewichtsgleiche heterozygote Brattleboro-Ratten.

Zur Untersuchung der Freisetzung hypophysärer Peptide wurden einzelne Gruppen von Sprague-Dawley-Ratten verschiedenen pharmakologischen und endokrinologischen Behandlungen unterzogen. Eine Gruppe erhielt anstelle von Wasser eine 2%ige Kochsalzlösung über 5 Tage als alleinige Trinkflüssigkeit.

Eine andere Gruppe wurde unter Pentobarbitalnarkose beiderseits adrenaletomiert. Diese Ratten erhielten bis zum Zeitpunkt ihrer Tötung, 14 Tage nach der Operation, 0.9%ige Kochsalzlösung anstelle von Trinkwasser. Als Kontrolltiere dienten scheinoperierte Ratten.

Eine weitere Gruppe von Ratten erhielt im Trinkwasser 5 Tage Dexamethason (20 µg/ml), ihre tägliche Wasseraufnahme unterschied sich nicht signifikant von der entsprechenden Kontrollratten, die Wasser ohne Dexamethasonzusatz erhielten.

### 2.2. Teilung und Extraktion von Geweben

Nach Dekapitation der Tiere wurde der Schädel eröffnet, das Gehirn entnommen und sofort nach der Methode von Glowinski und Iversen (1966) in verschiedene Areale zerlegt; die Hypophysen wurden in situ in Vorderlappen und Mittel-Hinterlappen (= Hinterlappen mit daranhängendem Mittellappen)

getrennt. Für Freisetzungsexperimente in vitro wurden die Hypophysenmittelhinterlappen dann sofort in Gefäße mit Krebs-Ringer-Bicarbonat-Lösung bei 37°C transferiert (siehe unten).

Die zur Extraktion bestimmten Gewebeteile wurden in vorgewogene Plastikgefäße überführt, ihr Gewicht bestimmt und dann sofort nach Zugabe von 0.1 M HCl (3 Teile 0.1 M HCl auf 1 Teil Naßgewicht des Gewebes; im Falle von einzelnen Hypophysenlappen 300 µl) für 10 min. bei 96°C inkubiert. Anschließend wurden die Gewebe homogenisiert und bei 10.000 g für 10 min. zentrifugiert. Die Überstände wurden lyophilisiert und anschließend entweder in Radioimmunoassay (RIA-) Puffer, oder in entsprechenden Chromatographiepuffern wieder aufgelöst (siehe unten). Durch Zugabe kleiner Mengen <sup>125</sup>Jod-markierter synthetischer Opioid-Peptide zur Extraktion wurde die Recovery (Wiederauffindungsrate) dieser Peptide bestimmt; sie betrug für alle in dieser Studie untersuchten Opioid-Peptide in allen Geweben für dieses Extraktionsverfahren (incl. Homogenisation, Zentrifugation, Lyophilisation und Wiederauflösung in Puffer) über 80%. Damit war das oben beschriebene Extraktionsverfahren mit 0.1 M HCl allen anderen getesteten Extraktionsverfahren, auch bezüglich der recovery höhermolekularer Vorläuferformen dieser Peptide, überlegen (z.B. Extraktion mit 2 M Essigsäure; 1 M Essigsäure + 20 mM HCl oder saurem Aceton, jeweils 10 min. bei 96°C oder eiskalt ohne oder mit Enzymhemmern).

### 2.3. Radioimmunologische Bestimmungen

#### 2.3.1. Herstellung der Antiseren

Antiseren gegen Dynorphin<sub>1-13</sub> (Antiserum "Goldy"), gegen α-Neo-Endorphin, gegen Leu-Enkephalin und gegen 8-Endorphin wurden aus männlichen, 2 kg schweren Neuseeland-Kaninchen gewonnen. Zur Herstellung des Immunogens wurden

die Peptide an Rinder-Thyreoglobulin irreversibel mittels eines Carbo-diimid-Derivates (1-Aethyl-3-dimethyl-amino-propyl)-carbodiimid) gebunden. Dabei wurden jeweils etwa 10-20 Moleküle des synthetischen Opioid-Peptids in ein Molekül Thyreoglobulin inkorporiert. Die Konjugate zwischen den Opioid-Peptide mit Thyreoglobulin wurden mit komplettem Freund's Adjuvans geschüttelt und kleine Aliquots der milchigen Suspension an vielen Stellen am Rücken der Kaninchen streng intradermal injiziert. Nach 2 bis 3 Auffrischungsimpfungen im Abstand von etwa 3 Wochen wurden - 14 Tage nach der letzten Injektion - etwa 30 bis 50 ml Blut aus der Ohrvene der Tiere mit Hilfe einer Saugpumpe gewonnen. Nach Gerinnung des Blutes wurden die Proben zentrifugiert, die Seren in kleinere Menge aufgeteilt und bei  $-30^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Bezüglich der Herstellung der von anderen Stellen überlassenen Antiseren siehe Ghazarossian et al., 1980; Cone und Goldstein, 1982; Weber et al., 1982b,c).

### 2.3.2. Jodierung der Peptide

Die Jodierung der für die einzelnen RIAs erforderlichen radioaktiv markierten Peptide erfolgte mit Natrium- $^{125}\text{Jodid}$ . Dabei wurden 1 Millicurie (mCi) Natrium- $^{125}\text{Jodid}$  und 1 nMol Peptid in 50  $\mu\text{l}$  Phosphatpuffer (0.5 M, pH 7.5) gelöst. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 20  $\mu\text{g}$  Chloramin T eingeleitet und nach 20 sec. durch Zugabe der gleichen Menge an Natriummetabisulfit beendet. Mit Hilfe von Gelchromatographie an Bio-Gel P4-Säulen wurde die  $^{125}\text{Jod}$ -markierten Peptide anschließend gereinigt. Das Verfahren ergab spezifische Aktivitäten von 300 bis 600 Ci/mMol.

Für den Leu-Enkephalin- und Vasopressin-RIA wurden kommerziell erhältliche  $^{125}\text{Jod}$ -markierte Peptide verwendet (spezifische Aktivität ca. 600 bis 800 Ci/mMol).

### 2.3.3. Protokoll der Radioimmunoassays

Die radioimmunologischen Bestimmungen aller Peptide wurden, mit Ausnahme von Leu-Enkephalin, nach folgendem RIA-Protokoll durchgeführt: Antiseren, Standards und die zu messenden Proben wurden in geeigneter Weise mit Standard-RIA-Puffer (0.02 M Natrium-Phosphat, pH 7.5; 0.15 M NaCl, 0.01% Rinderserumalbumin; 0.1% Gelatine; 0.01% Thimerosal; 0.01% Triton-X-100) verdünnt. Das Endvolumen der Inkubation betrug 500 µl nach Zugabe von 10.000 cpm des  $^{125}$ Jod-markierten Peptides (je nach spezifischer Aktivität lag die Menge des radioaktiv markierten Peptids zwischen 4 und 10 fMol). Nach 12-16 Std. Inkubation bei 4°C erfolgte die Trennung des Antikörper-gebundenen Peptids vom freien Peptid durch Zugabe von 500 µl einer Suspension, die 1% Aktivkohle und 0.5% Rinderserumalbumin, gelöst in RIA-Puffer (ohne Triton-X-100) enthielt. Nach Zentrifugation wurde die Radioaktivität von 800 µl des Überstandes in einem Gamma-Zähler (mit 68% Zählhausbeute) bestimmt.

Das Protokoll zur Bestimmung von Leu-Enkephalin war identisch mit Ausnahme der Verwendung eines 0.05 M Natriumphosphat-Puffers (pH 7.5) anstelle des oben beschriebenen RIA-Puffers (für weitere Einzelheiten des RIA-Protokolls siehe Höllt et al., 1979).

### 2.3.4. Charakterisierung der Antiseren

Abbildung 3 zeigt die Spezifität und Sensitivität des Antiserums gegen Dynorphin<sub>1-13</sub> (Antiserum "Goldy"). Das Serum wurde im RIA in einer Endverdünnung von 1:50.000 verwendet. Als Endverdünnung wurde für alle Antiseren jeweils diejenige Verdünnung der Seren gewählt, die in der Lage war, ca. 30% von 10.000 cpm des jeweiligen  $^{125}$ Jod-markierten Peptids zu binden.

Alle übrigen Antiseren wurden zur Bestimmung ihrer Spezifität gegen folgende Peptide getestet: Dynorphin<sub>1-32</sub>, 1-17, 1-8, 1-7, 1-6,  $\alpha/\beta$ -Neo-Endorphin, Rimorphin,

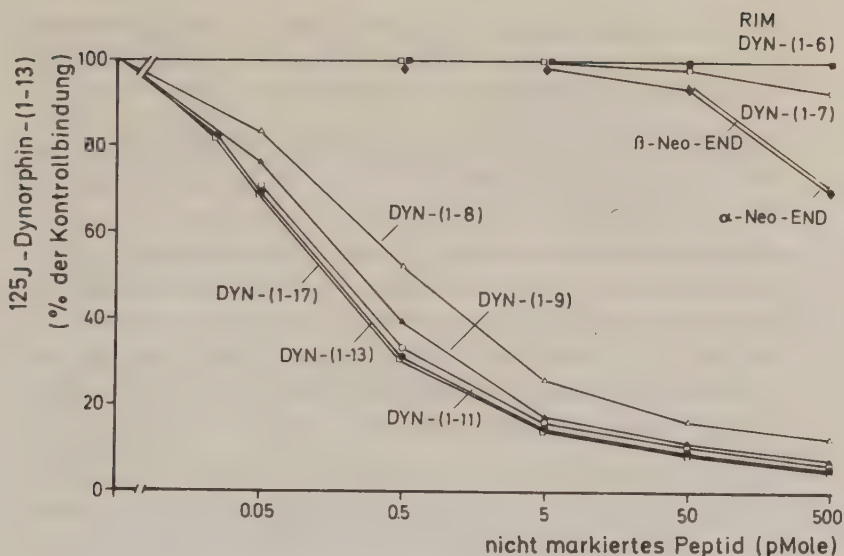


Abb. 3

Spezifität des Antiserums gegen Dynorphin<sub>1-13</sub> (Antiserum "Goldy"). Im Kontrollbindungsansatz wurden ca. 4000 cpm des <sup>125</sup>Jod-markierten Peptids an das Antiserum (Endverdünnung 1:50.000) gebunden (ca. 30% der Gesamtradioaktivität). Zugabe nichtradioaktiver, vom Antiserum erkannte Peptide bewirkt eine Verdrängung des markierten Peptids von den spezifischen Bindungsstellen des Antiserums. DYN = Dynorphin; α-/β-Neo-END = α-/β-Neo-Endorphin. RIM = Rimorphin.

Leu-Enkephalin, Leu-Enkephalin-Lys<sup>6</sup>, Met-Enkephalin, Peptid E, Peptid F, BAM-12P, BAM-22P, Met-Enkephalin-Arg<sup>6</sup>-Phe<sup>7</sup>, Met-Enkephalin-Arg<sup>6</sup>-Gly<sup>7</sup>-Leu<sup>8</sup>; Tyr-Gly-Gly-Phe; Gly-Gly-Phe-Leu, β-Endorphin, α-N-acetyl-β-Endorphin, β-Lipotropin, Vasopressin, Oxytocin.

Als Sensitivitätsgrenze wurde die Menge an synthetischem Peptid zugrundegelegt, die in der Lage war, 10% des jeweiligen <sup>125</sup>J-markierten Peptids aus seiner Antikörperbindung zu verdrängen.

Dynorphin<sub>1-17</sub>-Antiserum: 100% Kreuzreaktivität zu Dynorphin<sub>1-32</sub>, keine sonstigen Kreuzreaktivitäten; Sensitivität: ca. 10 fMol; Endverdünnung: 1:100.000.

Dynorphin<sub>1-8</sub>-Antiserum: hoch spezifisch für Dynorphin<sub>1-8</sub>, keine sonstigen Kreuzreaktivitäten; Sensitivität: ca. 15 fMol; Endverdünnung: 1:200.000.

$\alpha$ -Neo-Endorphin-Antiserum: 10% Kreuzreaktivität zu  $\beta$ -Neo-Endorphin, sonst keine Kreuzreaktivitäten; Sensitivität: 15 fMol; Endverdünnung: 1:30.000.

$\beta$ -Neo-Endorphin-Antiserum: hoch spezifisch für  $\beta$ -Neo-Endorphin, keine sonstigen Kreuzreaktivitäten; Sensitivität: 15 fMol; Endverdünnung: 1:8.000.

Rimorphin-(Dynorphin B-)Antiserum: 30% Kreuzreaktivität zu Dynorphin<sub>1-32</sub>, keine sonstigen Kreuzreaktivitäten; Sensitivität: 5 fMol; Endverdünnung: 1:80.000.

Leu-Enkephalin-Antiserum: 3% Kreuzreaktivität zu Met-Enkephalin, keine sonstigen Kreuzreaktivitäten; Sensitivität: 30 fMol; Endverdünnung: 1:3.000.

$\beta$ -Endorphin-Antiserum "Horace": 100% Kreuzreaktivität zu  $\beta$ -Lipotropin und  $\alpha$ -N-acetyl- $\beta$ -Endorphin, sonst keine Kreuzreaktivitäten; Sensitivität: 5 fmol; Verdünnung 1:80.000.

Vasopressin-Antiserum (kommerziell erhältlich): 0,5 % Kreuzreaktivität zu Oxytocin, sonst keine Kreuzreaktivitäten; Sensitivität: 2 fMol; Endverdünnung nach Angaben des Herstellers.

## 2.4. Immunopräzipitation

Zur Immunopräzipitation Dynorphin-immunoreaktiver Peptide wurde ein gereinigtes Antiserum gegen Dynorphin<sub>1-13</sub> (Antiserum "Goldy") verwendet. Die Reinigung des Antiserums war erforderlich, um den möglichen Abbau der sehr instabilen Dynorphin-Peptide durch die im Antiserum vorhandenen Enzyme während der Inkubation zu verhindern. (Es sind bei der

Immunpräzipitation, im Vergleich zum RIA, relativ hohe Antiserum-Konzentrationen erforderlich).

Antiserum "Goldy" wurde nach der Methode von Ey et al. (1978) gereinigt. Dabei wurden die IgG-Immunglobuline, die bei pH 5.6 von der verwendeten Protein A-Sepharose Säule eluierten, verwendet.

Die Spezifität des Antiserums wurde durch die Reinigungsprozedur nicht verändert. Dabei behielt das Dynorphin-Antiserum auch die Eigenschaft,  $\alpha$ -N-acetylierte Derivate von Dynorphin-Peptiden jeweils genauso gut zu erkennen wie die entsprechenden, nicht acetylierten Dynorphin-Peptide; dies war für die Untersuchung einer möglichen  $\alpha$ -N-Acetylierung von Dynorphin-Peptiden von besonderer Bedeutung (siehe Seizinger et al., 1982a).

Die lyophilisierten Extrakte von 100 Rattenhypophysen-mittelhinterlappen wurden in 700  $\mu$ l RIA-Puffer, 100  $\mu$ l "Puffer E" und 200  $\mu$ l "Puffer F" (nach Eipper und Mains, 1978) aufgelöst, auf pH 7.4 eingestellt, in 4 Fraktionen geteilt und mit je 10  $\mu$ l des gereinigten Dynorphin-Antiserums (Titer ca. 1:30.000) für 12-16 Std. bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden je 6.5 I.E. Ziegen-anti-Kaninchen-Gammaglobulin zugegeben und bei 4°C für 4 Std. weiter inkubiert. Die bei der anschließenden Zentrifugation entstehenden Niederschläge wurden mit RIA-Puffer gewaschen und schließlich in 10% (v/v) Essigsäure bei 96°C (10 min.) aufgelöst; dabei lösten sich die Immunkomplexe zwischen Ziegen-Antikörper und Kaninchen IgG, sowie auch die zwischen Kaninchen IgG und den (Dynorphin-) Peptiden (siehe hierzu auch Seizinger und Höllt, 1980; Seizinger et al., 1982a). Das beschriebene Immunpräzipitationsverfahren hatte für alle Dynorphin-Formen aus den Gewebextrakten eine Wiederauffindungsrate von nahezu 100%. Die durch Immunpräzipitation gereinigten Dynorphin-Komponenten wurden mittels Gelchromatographie anschließend weiter aufgetrennt (siehe unten).

## 2.5. Chromatographische Verfahren

### 2.5.1. Gelchromatographie

Zur gelchromatographischen Auftrennung von Peptiden nach Molekulargewicht wurden Sephadex G-50 superfine-Säulen verwendet (0.9 x 90 cm, bzw. 1.6 x 90 cm). Als Elutionspuffer dienten 0.1 M, 1 M oder 2.5 M (= 15% (v/v)) Essigsäure, bzw. 4 M Guanidin-HCl. Bei einer Elutionsgeschwindigkeit von 5 ml/h (0.9 x 90 cm-Säulen) bzw. 15 ml/h (1.6 x 90 cm-Säulen) wurden 1 ml-, bzw. 3 ml-Fractionen bei 6°C gesammelt. Alle untersuchten (endogenen und synthetischen) Peptide zeigten auf diesen Säulen ein recovery von über 90%.

### 2.5.2. Hochdrucksflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Als weiteres Trennverfahren für Peptide wurde die Hochdrucksflüssigkeitschromatographie (HPLC) verwendet. Dabei wurden HPLC  $\mu$ -Bondapak C 18 reverse phase Säulen (3.9 x 300 mm) eingesetzt. Als hydrophile Puffersysteme dienten alternativ 1 M Essigsäure (pH 2.5), 0.1 M Essigsäure (pH 4), 200 mM Ammoniumformiat (auf pH 4 adjustiert) und 25% (v/v) Essigsäure mit 0.1 M NaCl (auf pH 2.5 adjustiert). Die Peptide wurden von den Säulen jeweils mit einem linearen Gradienten von 5% auf 40% Acetonitril in 35 min. eluiert. Bei einer Flußgeschwindigkeit von 2 ml/min. wurden jeweils 1 ml-Fractionen gesammelt, lyophilisiert und, je nach weiterem Verwendungszweck, in verschiedenen Puffern wieder aufgelöst.

Alle untersuchten endogenen Peptide und die zur Standardisierung verwendeten synthetischen Peptide hatten auf allen HPLC-Systemen eine recovery von über 80%, außer Dynorphin<sub>1-32</sub> mit einer recovery von nur etwa 10-30% (je nach Puffersystem).

## 2.6. Enzymatische Methoden

Zur enzymatischen Freisetzung der Leu-Enkephalin Sequenz aus endogenen Dynorphin-Peptiden wurde nach einer Reihe von Vorversuchen das folgende optimierte Verfahren verwendet: Die verschiedenen durch Immunpräzipitation und Gelchromatographie gereinigten Dynorphin-Komponenten aus 100 Hypophysenmittelhinterlappen wurden in je 200  $\mu$ l eines 0.05 M Tris-HCl-Puffers (pH 8.5) aufgelöst und mit je 400 ng Rinder-Trypsin für 5 Std. bei 37°C inkubiert. Nach anschließender Inkubation für 10 min. bei 96°C zur Inaktivierung von Trypsin wurden die tryptischen Spaltprodukte für 20 min. bei 37°C mit 50 ng Carboxypeptidase B inkubiert. Diese Reaktion wurde durch nochmalige 10minütige Inkubation bei 96°C gestoppt. Die Spaltprodukte wurden schließlich mit HPLC aufgetrennt und mit einem Leu-enkephalin-RIA analysiert (siehe oben).

## 2.7. In vitro Freisetzung aus isolierten Hypophysen

Zur Bestimmung der in vitro Freisetzung von Opioid-Peptiden wurden je 15 isolierte Hypophysenmittelhinterlappen in 1 ml Krebs-Ringer-Bicarbonat-Lösung bei 37°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Das Ringer-Medium enthielt 118 mM NaCl, 4.75 mM KCl, 2,54 mM  $\text{CaCl}_2$ , 1,19 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1.2 mM  $\text{MgSO}_4$ , 24 mM  $\text{NaHCO}_3$ , 11 mM Glucose und 1% Rinderserumalbumin. Das Medium wurde konstant mit 95%  $\text{O}_2$  und 5%  $\text{CO}_2$  begast. Nach einer 2-stündigen Vorinkubationsphase mit mehrmaligem Wechsel des Ringer-Mediums erfolgten die 90-minütigen Testperioden nach folgendem Schema: (1) Basale Freisetzung, (2) Stimulation mit 56 mM  $\text{K}^+$ , (3) Basale Freisetzung, (4) Stimulation mit 56 mM  $\text{K}^+$ . In dazu parallelen Experimenten wurde nach demselben Schema die in vitro Freisetzung von Opioid-Peptiden aus Hypophysenmittelhinterlappen in Abwesenheit von  $\text{Ca}^{++}$  im Ringer-Medium untersucht. Nach den jeweiligen Inkubationsperioden wurden die

verschiedenen Opioid-Peptide in Aliquots der Inkubationsmedien sofort radioimmunologisch untersucht.

## 2.8. Plexus-myentericus-Längsmuskel-Präparat des Meerschweinchendünndarms

Die biologische Aktivität von Opioid-Peptiden wurde am Plexus-myentericus-Längsmuskel-Präparat des Meerschweinchendünndarms untersucht.

Die Präparation erfolgte nach der von Schulz und Goldstein (1972) beschriebenen Technik. Der Längsmuskel mit dem anhaftenden Plexus myentericus wurde dabei vom übrigen Gewebe des Ileums abgetrennt. 5 cm lange Nerv-Muskelstreifen wurden in einem 5 ml-Organbad in Krebs-Ringer-Lösung (siehe oben) unter Zusatz von 11 mM Glucose, 20  $\mu$ M Cholinchlorid und 0,125  $\mu$ M Pyralaminmaleat bei 37°C suspendiert. Das Ringer-Medium wurde mit 95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub> begast. Maximale Muskelkontraktion wurde durch elektrische Impulse (0,5 msec 80 Volt, Frequenz 0,1 Hz) ausgelöst. Ein Polygraph registrierte die isometrischen Kontraktionen.

### 3. MATERIALIEN

#### 3.1. Tiere

Sprague-Dawley-Ratten, Neuseeland-Kaninchen und Meer-schweinchen (Jautz, Kisslegg, BRD). Homozygote Brattleboro-Ratten und heterozygote Kontrollen (Central proefdieren-bedrijft, Zeist, Niederlande).

#### 3.2. Peptide und Pharmaka

Schweine- $\beta$ -Lipotropin (Dr. L. Gráf, Budapest, Ungarn), Vasopressin (Ferring, Kiel, BRD). Alle sonstigen Peptide (Peninsula Lab., San Carlos, CA., USA), Dexamethason (Sigma, Taufkirchen, BRD), Naloxon (Endo Lab., New York, USA).

#### 3.3. Enzyme

Trypsin und Carboxypeptidase B (Boehringer, Mannheim, BRD), Chymotrypsin (Sigma, Taufkirchen, BRD).

#### 3.4. Immunchemikalien

Freund's Adjuvans (Roth, Karlsruhe, BRD), Ziegen-anti-Kaninchen-Gammaglobulin und Vasopressin-Antiserum (Calbiochem-Behring, Lahn, BRD). Rimorphin (= Dynorphin B)-Antiserum (Dr. A. Goldstein, Stanford University, CA., USA). Dynorphin<sub>1-17</sub><sup>-</sup>, Dynorphin<sub>1-8</sub><sup>-</sup> und  $\beta$ -Neo-Endorphin-Antiserum (Dr. E. Weber, Stanford-University, CA., USA).

#### 3.5. Radioaktive Substanzen

Natrium-<sup>125</sup>Jodid (Amersham, Braunschweig, BRD), <sup>125</sup>Jod-markiertes Leu-Enkephalin und Vasopressin, <sup>3</sup>H-Glycin (New England Nuclear, Dreieich, BRD).

### 3.6. Sonstige Materialien

Sephadex G-50 superfine Packmaterial (Deutsche Pharmacia, Freiburg, BRD). Bio-Gel P<sub>4</sub>, Guanidin, Triton X-100 (Bio-Rad, München, BRD).  $\mu$ -Bondapak C<sub>18</sub> reverse phase Säulen (3.9 x 300 mm) für die HPLC (Waters, Königstein, BRD). Sämtliche Flüssigkeiten für die HPLC (Baker, Groß-Gerau, BRD). Alle sonstigen Chemikalien (Sigma, Taufkirchen, BRD).

#### 4. ERGEBNISSE

##### 4.1. Charakterisierung, Identifizierung und regionale Verteilung von Proenkephalin B-Peptiden in Hypophyse, Zentralnervensystem und peripheren Organen der Ratte

###### 4.1.1. DYNORPHIN-immunoreaktive Komponenten

Das Opioid-Peptid Dynorphin<sub>1-17</sub> konnte aus Schweinehypophysen und Schweinedarm isoliert werden (Goldstein et al., 1981; Tachibani et al., 1982; siehe Abb. 1). Mit Hilfe eines Antiserums gegen Dynorphin<sub>1-17</sub> wurde die Verteilung von Dynorphin-immunoreaktiven Peptiden (ir-Dynorphin) im Zentralnervensystem, in der Hypophyse und in peripheren Organen der Ratte bestimmt. Wie Tabelle I, Spalte 1, und Abb. 4 zeigen, wurde ir-Dynorphin in mit Abstand höchsten Konzentrationen in der Hypophyse, besonders im Hypophysenmittelhinterlappen gefunden. Aber auch in fast allen Arealen des Zentralnervensystems (ZNS) konnte ir-Dynorphin nachgewiesen werden, und zwar mit folgenden Konzentrationen in absteigender Reihenfolge: Hypothalamus > Rückenmark > Striatum, Hippocampus, Mittelhirn > Medulla/Pons, Thalamus > Cortex > Cerebellum. Ebenfalls einige periphere Organe, z.B. Dünndarm, Magen und Lunge enthielten Dynorphin-Immunoaktivität.

Bei diesen Daten ist zu berücksichtigen, daß häufig von den im Radioimmunoassay verwendeten Antiseren nicht nur die jeweiligen Peptide selbst, sondern auch größere Vorläufermoleküle und kleinere Abbauprodukte dieser Peptide mit erkannt werden. Darüber hinaus erkennen Antiseren oftmals auch nicht, ob ein Peptid modifiziert ist (z.B. durch Acetylierung am N-Terminus). Derartige Modifikationen beeinflussen die biologische Aktivität von Peptiden mitunter entscheidend. Zur genaueren Charakterisierung verschiedener Dynorphin-immunoreaktiver Opioid-Peptide war es daher unerlässlich, immunologische Methoden mit

TABELLE I p e p t i d - K o n z e n t r a t i o n e n (pMol/g Gewebe)

| STRUKTUR                            | Ir-DYNORPHIN <sub>1-17</sub> | Ir-DYNORPHIN <sub>1-8</sub> | Ir-RIMORPHIN       | Ir- $\alpha$ -NEO-<br>ENDORPHIN | Ir- $\delta$ -NEO-<br>ENDORPHIN |
|-------------------------------------|------------------------------|-----------------------------|--------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| Mittelhinterlappen<br>der Hypophyse | 1117,0 $\pm$ 97,3            | 864,3 $\pm$ 44,7            | 1710,5 $\pm$ 165,3 | 1940,5 $\pm$ 320,8              | 1709,1 $\pm$ 205,2              |
| Vorderlappen<br>der Hypophyse       | 588,1 $\pm$ 61,7             | < 1,0                       | 605,1 $\pm$ 44,3   | 110,1 $\pm$ 27,4                | 55,7 $\pm$ 4,0                  |
| Hypothalamus                        | 69,5 $\pm$ 9,5               | 43,6 $\pm$ 2,9              | 47,4 $\pm$ 4,2     | 94,1 $\pm$ 16,8                 | 18,1 $\pm$ 1,1                  |
| Striatum                            | 8,7 $\pm$ 0,9                | 89,2 $\pm$ 8,5              | 19,8 $\pm$ 1,8     | 33,6 $\pm$ 8,1                  | 1,9 $\pm$ 0,3                   |
| Thalamus                            | 8,2 $\pm$ 0,6                | 36,9 $\pm$ 3,4              | 16,2 $\pm$ 1,2     | 23,7 $\pm$ 4,7                  | 2,1 $\pm$ 0,2                   |
| Mittelhirn                          | 17,8 $\pm$ 0,9               | 37,6 $\pm$ 3,7              | 18,6 $\pm$ 1,8     | 22,7 $\pm$ 5,7                  | 6,2 $\pm$ 0,4                   |
| Hippocampus                         | 12,4 $\pm$ 0,8               | 15,5 $\pm$ 1,7              | 15,0 $\pm$ 1,2     | 15,7 $\pm$ 3,1                  | 2,2 $\pm$ 0,3                   |
| Medulla / Pons                      | 15,8 $\pm$ 0,9               | 11,6 $\pm$ 1,0              | 7,2 $\pm$ 0,3      | 8,8 $\pm$ 1,5                   | 5,1 $\pm$ 0,6                   |
| Cortex                              | 6,1 $\pm$ 0,7                | 9,0 $\pm$ 1,2               | 1,8 $\pm$ 0,2      | 8,1 $\pm$ 2,2                   | 0,7 $\pm$ 0,1                   |
| Cerebellum                          | 1,3 $\pm$ 0,1                | 1,6 $\pm$ 0,1               | 0,6 $\pm$ 0,2      | 0,7 $\pm$ 0,3                   | 0,6 $\pm$ 0,1                   |
| Rückenmark                          | 15,0 $\pm$ 5,5               |                             |                    | 23,9 $\pm$ 6,6                  |                                 |
| Duodenum-Jejunum                    | 5,8 $\pm$ 2,1                |                             |                    | 12,9 $\pm$ 6,9                  |                                 |
| Magen                               | 3,5 $\pm$ 1,1                |                             |                    | 7,5 $\pm$ 3,7                   |                                 |
| Colon                               | 1,0 $\pm$ 0,4                |                             |                    | 2,2 $\pm$ 0,9                   |                                 |
| Lunge                               | 3,5 $\pm$ 1,0                |                             |                    | 5,9 $\pm$ 1,8                   |                                 |
| Leber                               | < 1,0                        |                             |                    | < 1,0                           |                                 |
| Niere                               | < 1,0                        |                             |                    | < 1,0                           |                                 |
| Nebenniere                          | < 1,0                        |                             |                    | < 1,0                           |                                 |

Regionale Konzentrationen von Opioid-Peptiden des Proenkephalin B-Systems in Zentralnervensystem, Hypophyse und peripheren Organen der Ratte.  
Die Konzentrationen repräsentieren Mittelwerte und Standardfehler aus den Bestimmungen von jeweils 10 Einzelgeweben. Ir = immunoreaktiv. (Für Details siehe: Methoden).

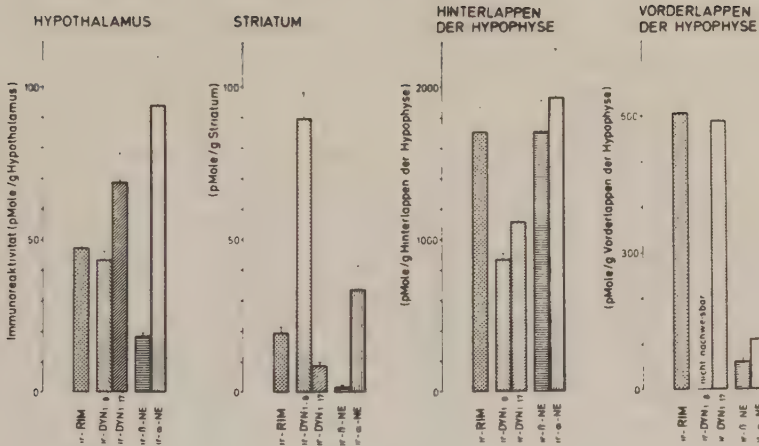


Abb. 4

Regionale Konzentrationen von immunoreaktivem (ir-) Rimorphin (RIM), Dynorphin<sub>1-8</sub> (DYN<sub>1-8</sub>), Dynorphin<sub>1-17</sub> (DYN<sub>1-17</sub>), β-Neo-Endorphin (β-NE) und α-Neo-Endorphin (α-NE) in Strukturen von Gehirn und Hypophyse der Ratte. Die Konzentrationen repräsentieren Mittelwerte und Standardfehler aus den Bestimmungen von jeweils 10 Einzelgeweben (für Details siehe: Methoden).

chromatographischen und enzymatischen Techniken, sowie mit biologischen Testsystemen zu kombinieren.

Abbildung 5 zeigt die gelchromatographische Auftrennung von Dynorphin-immunoreaktiven Komponenten\* aus

\*Dabei wurde ein Antiserum gegen die Teilsequenz Dynorphin<sub>1-13</sub> (Antiserum "Goldy") verwendet, das Dynorphin<sub>1-17</sub> zu 100% erkennt. Diesselben Molekulargewichtsformen mit Ausnahme der kleinstmolekularen Form mit einem ungefähren Molekulargewicht von 900 (Gipfel 4), konnten auch mit einem Antiserum gegen Dynorphin<sub>1-17</sub> nachgewiesen werden (siehe Absatz "RIMORPHIN"). Auch die relative Konzentration der verschiedenen Molekulargewichtsformen zueinander war mit beiden Antisera nahezu identisch.

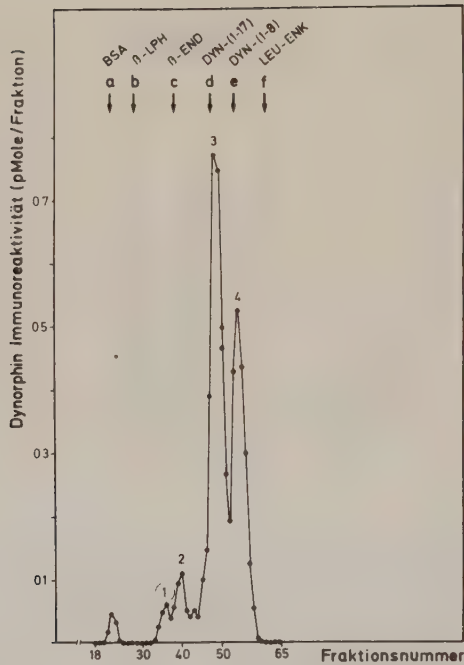


Abb. 5

Gelchromatographische Auftrennung verschiedener Molekulargewichtsformen von immunreaktivem Dynorphin aus Hinterlappen von Rattenhypophysen.

Die immunreaktiven Dynorphin-Komponenten wurden zunächst aus dem Extrakt von 100 (Mittel-)hinterlappen mittels Immunpräzipitation gereinigt (siehe Methoden). Nach Auflösen der Peptid-Antikörperkomplexe durch Erhitzen in 10% (v/v) Essigsäure wurde das Gemisch über eine Sephadex G-50 superfine Säule (0.9 x 90 cm) gegeben und in 0.1 M Essigsäure eluiert. In Aliquots der Fraktionen wurde immunreaktives Dynorphin mit einem Antiserum gegen Dynorphin<sub>1-13</sub> (Antiserum "Goldy") radioimmunologisch bestimmt (für Details: siehe Methoden).

Standardisierung der Säule:  $V_0$  = Ausschlußvolumen (Rinderserumalbumin);  $V_T$  = Gesamtvolumen der Säule;  $\beta$ -LPH =  $\beta$ -Lipotropin;  $\beta$ -END =  $\beta$ -Endorphin; DYN = Dynorphin; LEU-ENK = Leu-Enkephalin.

Mittelhinterlappen von Rattenhypophysen in 4 verschiedene Molekulargewichtsformen (Gipfel 1 bis 4). Am Beispiel dieses Gewebes soll nun im folgenden exemplarisch die Charakterisierung und Identifizierung der verschiedenen Dynorphin-Formen durch kombinierten Einsatz der sich ergänzenden immunologischen, chromatographischen, enzymatischen und biologischen Techniken demonstriert werden.

Bereits vor der Gelchromatographie wurden die Dynorphin Komponenten aus den Gewebeextrakten durch quantitative Immunpräzipitation mit einem Dynorphin-Antiserum gereinigt. Jede der vier Molekulargewichtsformen von ir-Dynorphin wurde nach der Gelchromatographie nochmals unter denaturierenden Bedingungen in 4 M Guanidin-HCl (und im Falle der höchstmolekularen Form zusätzlich auf SDS-Gelelektrophorese (Seizinger et al., 1981c)) rechromatographiert, um mögliche Aggregationen kleinerer Peptide, bzw. Gelmatrix-bedingte Elutionsverzögerungen von Peptiden weitgehend auszuschalten. Dabei ergaben sich keine wesentlichen Änderungen in den Molekulargewichten der in Abb. 5 gezeigten Dynorphin-Komponenten: Gipfel 1 zeigte ein Molekulargewicht von ca. 6000, Gipfel 2 ca. 3200, Gipfel 3 ca. 1700 und Gipfel 4 ca. 900. Gipfel 3, die molekulare Hauptform, wanderte exakt in Position von synthetischem Dynorphin<sub>1-17</sub> (siehe Seizinger et al., 1981b,c).

Dynorphin<sub>1-17</sub> enthält am N-Terminus die Sequenz des Opioid-Pentapeptids Leu-Enkephalin (Goldstein et al., 1981). Daher ist auch von größeren Vorläuferpeptiden und ebenso von noch opiataktiven kleineren Abbauprodukten von Dynorphin zu fordern, daß sie die Leu-Enkephalin-Sequenz enthalten. Deshalb wurden alle 4 Molekulargewichtsformen von Dynorphin auf die Anwesenheit der Leu-Enkephalin-Sequenz überprüft. Da Leu-Enkephalin in der Primärsequenz von Dynorphin mit dem C-terminalen Teil des Peptids durch 2 basische Aminosäuren (-Arg-Arg-) verbunden ist, läßt sich zunächst durch enzymatische Spaltung mit Trypsin das Hexapeptid Leu-Enkephalin-Arg<sup>6</sup> freisetzen. Durch anschließende Behandlung mit Carboxypeptidase B, einem Enzym, das selektiv basische

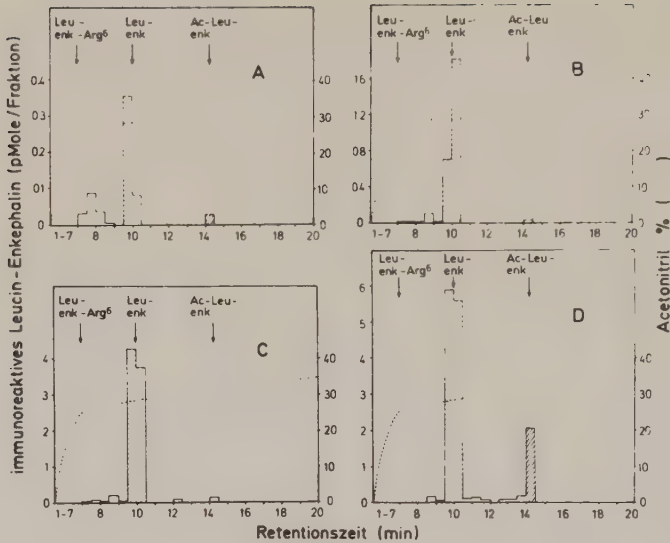


Abb. 6

Hochdrucksflüssigkeitschromatographie (HPLC) von immunoreaktivem Leu-Enkephalin, generiert durch enzymatische Spaltung der verschiedenen immunoreaktiven Dynorphin-Komponenten aus dem Hinterlappen der Rattenhypophyse.

Aliquots der mittels Gelchromatographie getrennten immunoreaktiven Dynorphin-Komponenten (1,2,3, 4 der Abb. 5) wurden zuerst mit Trypsin, anschließend mit Carboxypeptidase B enzymatisch gespalten und die Spaltprodukte mittels HPLC getrennt (für Details: siehe Methoden). Die Fraktionen wurden dann mit einem Antiserum, das Leu-Enkephalin und  $\alpha$ -N-acetyl-Leu-Enkephalin gleich gut erkennt, radioimmunologisch untersucht. Die Abbildung zeigt die immunoreaktiven Leu-Enkephalin-Komponenten, enzymatisch herausgespalten aus den immunoreaktiven Dynorphin-Formen 1 (A), 2 (B), 3 (C) und 4 (D). Leu-enk. = Leu-Enkephalin; Ac-Leu-enk. =  $\alpha$ -N-acetyl-Leu-Enkephalin.

Aminosäuren vom C-terminalen Ende von Peptiden abspalten, entsteht schließlich Leu-Enkephalin.

Wie in Abb. 6 dargestellt, konnte aus jeder der 4

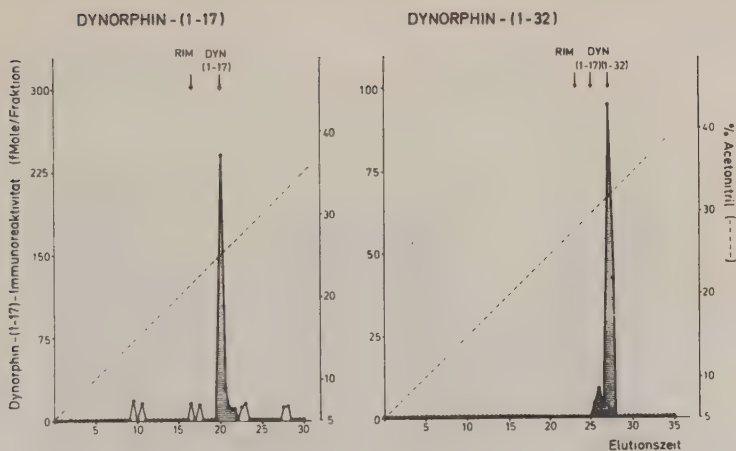


Abb. 7

Hochdrucksflüssigkeitschromatographie (HPLC) von immunoreaktivem Dynorphin<sub>1-17</sub> und Dynorphin<sub>1-32</sub> aus Hinterlappen von Rattenhypophysen nach Immunpräzipitation und Gelchromatographie. Die mittels Immunpräzipitation und Gelchromatographie gereinigten immunoreaktiven Dynorphin-Komponenten 3 und 2 (siehe Abb. 5) mit Molekulargewichten von Dynorphin<sub>1-17</sub> bzw. von Dynorphin<sub>1-32</sub> wurden anschließend auf eine HPLC C 18 reverse phase Säule aufgetragen. Die Säule wurde für die Chromatographie von immunoreaktivem Dynorphin<sub>1-17</sub> mit 1 M Essigsäure (= Puffer I), für die Analyse von immunoreaktivem Dynorphin<sub>1-32</sub> mit 200 mM Ammoniumformiat (pH 4) (= Puffer II) eluiert. In beiden Fällen wurden die Peptide von der Säule mit Hilfe eines linearen Gradienten von 5% bis 40% Acetonitril in 35 min. abgelöst (für Details: siehe Methoden). Die HPLC-Fraktionierungen wurden schließlich mit einem Antiserum gegen Dynorphin<sub>1-17</sub>, das auch Dynorphin<sub>1-32</sub> zu 100% erkennt, radioimmunologisch untersucht. RIM = Rimorphin; DYN = Dynorphin.

verschiedenen Dynorphin-immunoreaktiven Komponenten die Leu-Enkephalin-Sequenz herausgespalten und durch Kombination von Hochdrucksflüssigkeitschromatographie (HPLC) mit

einem hoch spezifischen Leu-Enkephalin-Radioimmunoassay (RIA) nachgewiesen werden.

Interessanterweise konnte, mit Ausnahme eines sehr kleinen Anteils der kleinstmolekularen Form (Gipfel 4), kein  $\alpha$ -N-acetyl-Leu-Enkephalin aus Dynorphin-immunoreaktiven Peptiden freigesetzt werden (siehe Abb. 6); dies wäre dann der Fall gewesen, wenn Dynorphin-Peptide an der  $\alpha$ -Aminogruppe dieser N-terminalen Leu-Enkephalin-Sequenz acetyliert wären. (Das Leu-Enkephalin-Antiserum hätte  $\alpha$ -N-acetyl-Leu-Enkephalin genauso gut erkannt wie Leu-Enkephalin (Seizinger et al., 1981a).

Die Acetylierung der  $\alpha$ -Aminogruppe von Peptiden hat in jüngster Zeit für Opioid-Peptide Bedeutung erlangt, da sie zu einer völligen Inaktivierung aller Opiateigenschaften von Opioid-Peptiden führt (siehe Diskussion).

Mit Hilfe einer Reihe von HPLC-Analysen war eine weitere Identifizierung der Dynorphin-immunoreaktiven Komponenten 2 und 3 möglich. Abb. 7 zeigt stellvertretend jeweils nur eine HPLC-Analyse für Gipfel 2 und 3. Wie in Abb. 7 (links) dargestellt, wanderte Gipfel 3 exakt in Position des synthetischen Heptadecapeptids Dynorphin<sub>1-17</sub>, während Gipfel 2 (Abb. 7 rechts) genau in Position von synthetischem Dynorphin<sub>1-32</sub> eluierte (Dynorphin<sub>1-32</sub>, vor kurzem aus Schweinehypophysen isoliert (Fischli et al., 1982), enthält am N-Terminus die Sequenz von Dynorphin<sub>1-17</sub>, welche durch zwei basische Aminosäuren mit der Sequenz eines weiteren Opioid-Peptides, Rimorphin, verbunden ist; siehe Abb. 2).

Ein weiterer Hinweis für die Identität von Gipfel 2 mit Dynorphin<sub>1-17</sub> war die extrem hohe opiatartige Wirkung dieses endogenen Rattenpeptids an der Plexus-myentericus Längsmuskelpräparation des Meerschweinchen-Ileums. In diesem "klassischen" biologischen Testpräparat bewirken Opiate und Opioid-Peptide eine Hemmung der durch elektrische

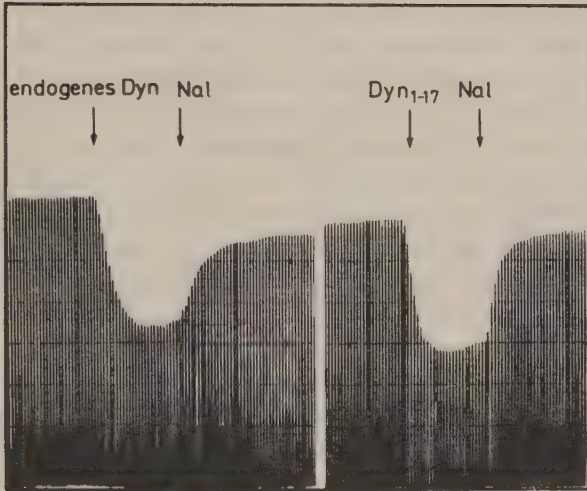


Abb. 8

Biologische Wirkung von endogenem Dynorphin aus dem Hinterlappen der Rattenhypophyse an der Plexus-myentericus Längsmuskelpräparation des Meer-schweinchendünndarms.

Die immunoreaktive Dynorphin-Komponente mit einem Molekulargewicht von synthetischem Dynorphin<sub>1-17</sub> (Komponente 3) wurde aus 50 Hypophysen (mittel-) hinterlappen von Ratten mittels Immunpräzipitation und Gelchromatographie isoliert, wie in der Legende zu Abb. 5 beschrieben. Die linke Hälfte zeigt den Effekt von 0.5 nM des endogenen Dynorphin (DYN) der Ratte in der Badflüssigkeit; die rechte Hälfte zeigt im Vergleich dazu den Effekt von 2 nM synthetischem Dynorphin<sub>1-17</sub>. Beide Wirkungen sind durch 500 nM des spezifischen Opiat-antagonisten Naloxon (Nal) aufhebbar (weitere Details: siehe Methoden).

Reizung ausgelösten Kontraktion des Muskelpräparates. Dynorphin<sub>1-17</sub> zeigt in diesem Testsystem die höchste Potenz aller bisher bekannten opiatartigen Substanzen (Goldstein et al., 1979; Chavkin et al., 1982; Corbett et al., 1982; Schulz et al., 1983). Wie Abb. 8 darstellt, besaß die endogene Dynorphin-Komponente 3 aus Rattenhypophysen etwa

gleich hohe Opiataktivität wie synthetisches Dynorphin<sub>1-17</sub>; die opiatartige Wirkung war in beiden Fällen durch den spezifischen Opiatantagonisten Naloxon aufhebbar.

Auch die Molekulargewichtsformen 1, 2 und 4 zeigten Opiataktivität in diesem Testpräparat; dies weist darauf hin, daß auch diese am N-Terminus die Leu-Enkephalin-Sequenz tragen; die geringen Mengen des zur Verfügung stehenden endogenen Materials, sowie die im Vergleich zu Dynorphin<sub>1-17</sub> deutlich geringeren Opiataktivitäten (in diesem Bioassay) ließen allerdings eine Quantifizierung nicht zu.

Das bei der Analyse der verschiedenen Dynorphin-Komponenten verwendete Dynorphin-Antiserum erkannte, neben Dynorphin<sub>1-17</sub> und 2 höhermolekularen Formen, auch eine kleinermolekulare Form (Gipfel 4). Dieses Peptid mit einem Molekulargewicht von ca. 900 enthielt auch, wie oben dargestellt, die Leu-Enkephalin-Sequenz. Durch Vergleich mit einer Reihe von synthetisch hergestellten Teilsequenzen von Dynorphin<sub>1-17</sub> auf verschiedenen HPLC-Systemen konnte dieses Peptid schließlich als Dynorphin<sub>1-8</sub>, d.h. als N-terminales Opioid-Oktapeptid von Dynorphin<sub>1-17</sub> identifiziert werden. Abb. 9 zeigt als Beispiel 2 HPLC-Analysen, in denen das Dynorphin-immunoreaktive Peptid gleich wie synthetisches Dynorphin<sub>1-8</sub> wanderte. Da das bei dieser Analyse verwendete Antiserum gegen Dynorphin<sub>1-13</sub> das Opioid-Peptid Dynorphin<sub>1-8</sub> nur mit einer Kreuzreaktivität von ca. 20% erkennt, kommt Dynorphin<sub>1-8</sub> (Gipfel 4) im Hypophysenhinterlappen in etwa ähnlich hoher Konzentration vor wie Dynorphin<sub>1-17</sub> (Gipfel 3).

Im ZNS ergab sich sogar ein deutliches Überwiegen von Dynorphin<sub>1-8</sub> gegenüber Dynorphin<sub>1-17</sub>. Abb. 10 zeigt die gelchromatographische Auftrennung Dynorphin-immunoreaktiver Komponenten in einer Reihe von Hirnarealen, dem Rückenmark und Ileum, sowie aus Hypophysenvorder- und -mittelhinterlappen der Ratte. In allen Arealen, mit Ausnahme des Hypophysenvorderlappens, wurden 4 verschiedene Dynorphin-Komponenten gefunden; Gipfel 1 repräsentiert die hochmolekulare

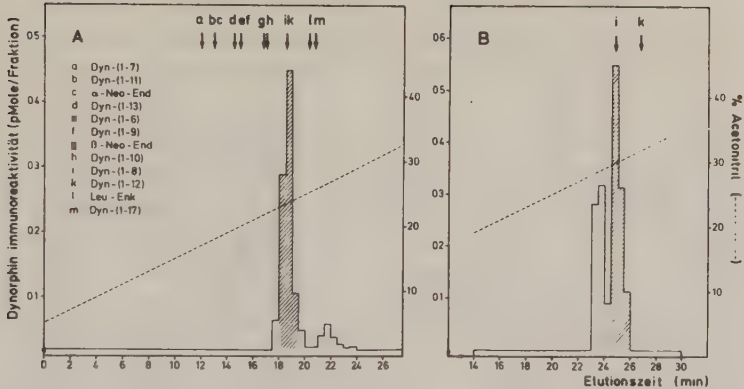


Abb. 9

Analyse der kleinstmolekularen Komponente von immunreaktivem Dynorphin aus dem Hinterlappen der Rattenhypophyse mit Hochdrucksflüssigkeitschromatographie (HPLC).

Die mittels Immunpräzipitation und Gelchromatographie gereinigte immunreaktive Dynorphin-Komponente 4 mit einem Molekulargewicht von etwa 900 (siehe Abb. 5) wurde anschließend auf einer HPLC C 18 reverse phase Säule mit Puffersystem I chromatographiert (linkes Bild). Die HPLC-Fractionen wurden mit einem Dynorphin-Radioimmunoassay (mit Antiserum "Goldy" gegen Dynorphin<sub>1-13</sub>) analysiert. Diejenige Dynorphin-Komponente, die dabei in Position von synthetischem Dynorphin<sub>1-8</sub> wanderte, wurde daraufhin auf einer HPLC C 18 reverse phase Säule mit Puffersystem II chromatographiert (rechtes Bild). Die HPLC-Fractionen wurden abschließend nochmals mit dem Dynorphin-Antiserum radioimmunologisch untersucht.

(Puffersystem I und II und weitere Details zur HPLC-Analyse: siehe Legende zu Abb. 7 und Methoden). Dyn = Dynorphin.

6000 Dalton Form, Gipfel 2 Dynorphin<sub>1-32</sub>, Gipfel 3 Dynorphin<sub>1-17</sub>, Gipfel 4 Dynorphin<sub>1-8</sub>. In Anbetracht der nur

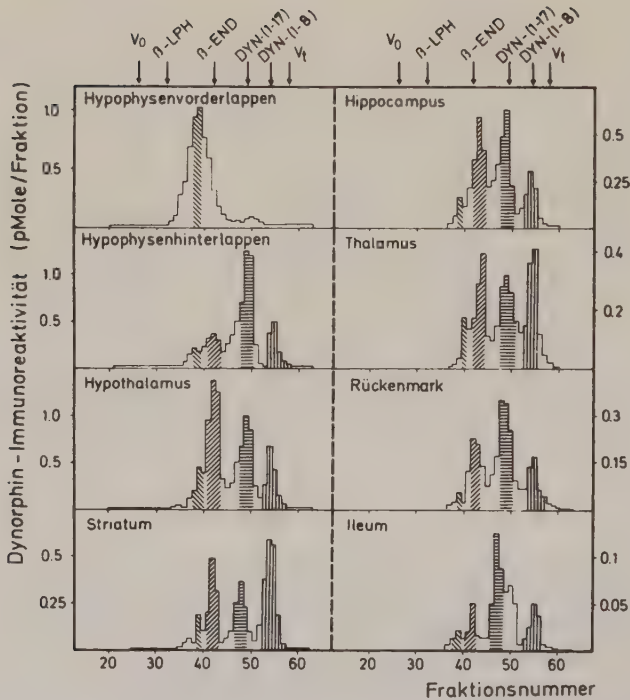


Abb. 10

Gelchromatographische Auftrennung verschiedener Molekulargewichtsformen von immunreaktivem Dynorphin aus verschiedenen Strukturen des Gehirns, des Rückenmarks, der Hypophyse und des Ileums der Ratte.

Die Extrakte der verschiedenen Gewebe wurden auf einer Sephadex G-50 superfine-Säule (1.6 x 90 cm) mit 0.1 M Essigsäure als Elutionspuffer chromatographiert. In Aliquots der Fraktionen wurde immunoreaktives Dynorphin mit einem Antiserum gegen Dynorphin<sub>1-13</sub> (Antiserum "Goldy") radioimmunologisch bestimmt (für Details: siehe Methoden).  $V_0$  = Ausschlußvolumen (Rinderserumalbumin);  $V_T$  = Gesamtvolumen der Säule;  $\beta$ -LPH =  $\beta$ -Lipotropin;  $\beta$ -END =  $\beta$ -Endorphin; DYN = Dynorphin.

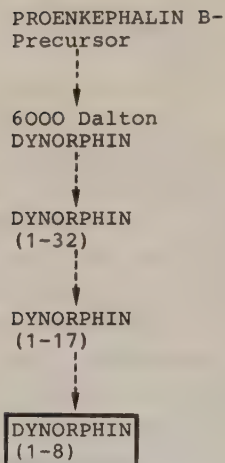
20%igen Kreuzreaktivität des Dynorphin<sub>1-13</sub> Antiserum zu Dynorphin<sub>1-8</sub> (im Vergleich mit 100% Kreuzreaktivität zu Dynorphin<sub>1-17</sub> und Dynorphin<sub>1-32</sub>) stellt Dynorphin<sub>1-8</sub> vor allem im Striatum und Thalamus bei weitem die Hauptform der verschiedenen Dynorphin-Komponenten dar.

Diese Befunde ließen sich mit Hilfe eines hochspezifischen Antiserums, das nur Dynorphin<sub>1-8</sub> erkennt, weiter untermauern. (Die Identität der radioimmunologisch bestimmten Dynorphin<sub>1-8</sub>-Immunoreaktivitäten (ir-Dynorphin<sub>1-8</sub>) mit dem synthetischen Oktapeptid Dynorphin<sub>1-8</sub> wurde zusätzlich mit Hilfe von Gelchromatographie und HPLC für alle Gewebe nachgewiesen. Tabelle I, Spalte 2, und Abb. 4 zeigen die radioimmunologisch bestimmte Verteilung von ir-Dynorphin<sub>1-8</sub> in verschiedenen Hirn- und Hypophysengeweben. Innerhalb des Gehirns fanden sich die mit Abstand höchsten Konzentrationen von ir-Dynorphin<sub>1-8</sub> im Striatum, einer Struktur, in der ir-Dynorphin<sub>1-17</sub> in 10mal geringerer Konzentration nachzuweisen war (siehe Tabelle I, Spalte 1, und Abb. 4). Ähnlich wie im Striatum war auch im Thalamus ir-Dynorphin<sub>1-8</sub> deutlich höher konzentriert als ir-Dynorphin<sub>1-17</sub>, während Hypothalamus, Mittelhirn, Hippocampus, Pons/Medulla, Cortex und Cerebellum, sowie der Hypophysenhinterlappen etwa gleich hohe Konzentrationen beider Opioid-Peptide aufwiesen.

Dynorphin<sub>1-8</sub> war, im Gegensatz zu allen anderen untersuchten Geweben, in Vorderlappen der Hypophyse nicht nachzuweisen. Darüber hinaus existieren, wie in Abb. 10 zu sehen ist, auch Dynorphin<sub>1-17</sub> und Dynorphin<sub>1-32</sub> im Vorderlappen nicht. Die gesamte Dynorphin-Immunoreaktivität besteht in diesem Gewebe, im Unterschied zu sämtlichen anderen Strukturen, ausschließlich aus der hochmolekularen Komponente mit einem Molekulargewicht von ca. 6000.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß verschiedene Gewebe eine höchst unterschiedliche Verteilung verschiedener Dynorphin-Formen aufweisen; dies läßt auf eine selektive, gewebespezifische Spaltung des Dynorphin-Vorläuferpeptids

STRIATUM:



VORDERLAPPEN der HYPOPHYSE:

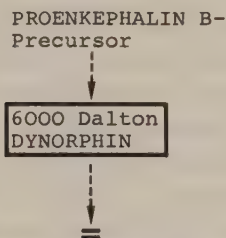


Abb. 11

Schematische Darstellung der möglichen enzymatischen Spaltung des Dynorphin-Vorläufermoleküls Proenkephalin B in Striatum und Hypophysenvorderlappen.

schließen.

Wie in Abb. 11 schematisch dargestellt, scheint im Striatum die enzymatische Spaltung des 30.000 Dalton Vorläufermoleküls (Kakidani et al., 1982) über die 6000 Dalton-Form von Dynorphin, Dynorphin<sub>1-32</sub>, Dynorphin<sub>1-17</sub> bis hin zu Dynorphin<sub>1-8</sub> als eigentliches Hauptendprodukt dieses Biosyntheseweges abzulaufen; eventuell erfolgt die Spaltung zum Teil noch weiter zu Leu-Enkephalin. Hingegen wird im Hypophysenvorderlappen diese enzymatische Spaltung offensichtlich bereits auf der Ebene des 6000 Dalton-Dynorphin beendet, so daß weder Dynorphin<sub>1-32</sub> oder Dynorphin<sub>1-17</sub> noch Dynorphin<sub>1-8</sub> entstehen.

#### 4.1.2. RIMORPHIN-immunoreaktive Komponenten

Rimorphin, ein Opioid-Peptid mit 13 Aminosäuren, konnte vor kurzem aus Rinderhypophysen isoliert werden (Kilpatrick et al., 1982; siehe Abb. 1). Die komplette Strukturaufklärung des neuen Opioid-Vorläufermoleküls Pro-enkephalin B ergab, daß neben Dynorphin und  $\alpha$ -Neo-Endorphin auch die Sequenz von Rimorphin darin enthalten war (Kakidani et al., 1982, siehe Abb. 2). Da aber Rimorphin innerhalb dieser Sequenz am C-Terminus nicht von der für Prohormone typischen Spaltungssequenz zweier basischer Aminosäuren flankiert ist, blieb zunächst unklar, ob Rimorphin selbst, oder nur eine C-terminal verlängerte Form von Rimorphin existiert.

Um die Frage nach dem natürlichen Vorkommen von Rimorphin zu beantworten, wurden verschiedene Hirn- und Hypophysengewebe der Ratte gelchromatographisch aufgetrennt und mit Hilfe eines Radioimmunoassays gegen die Sequenz von Rimorphin untersucht. Wie in den gelchromatographischen Analysen Rimorphin-immunoreaktiver Komponenten in Abb. 12 (schraffierte Areale) dargestellt, wanderte der Hauptteil von ir-Rimorphin in allen untersuchten Hirnarealen und im Mittelhinterlappen der Hypophyse in Position des synthetischen Tridecapeptides Rimorphin. Die Identität dieser immunoreaktiven Hauptkomponente mit synthetischem Rimorphin wurde schließlich mit Hilfe mehrerer Analysen auf verschiedenen HPLC-Systemen bestätigt. Abb. 13 zeigt als Beispiel HPLC-Analysen der Rimorphin-immunoreaktiven Hauptkomponenten aus Striatum, Hypothalamus und Hypophysenmittelhinterlappen; in allen Fällen wanderte das endogene Peptid genau in Position von synthetischem Rimorphin. Diese Ergebnisse machen es sehr wahrscheinlich, daß Rimorphin tatsächlich ein natürlich vorkommendes Opioid-Peptid neuraler Gewebe darstellt.

Wie aus Abb. 13 weiter ersichtlich, erkannte das

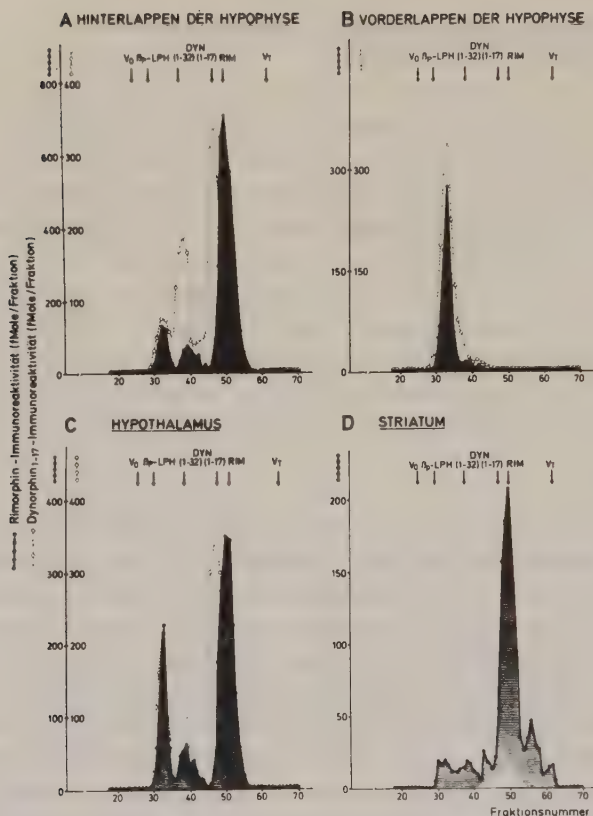


Abb. 12

Gelchromatographische Auftrennung verschiedener Molekulargewichtsformen von immunoreaktivem Rimorphin (schraffierte Flächen) im Vergleich zu immunoreaktivem Dynorphin (gestrichelte Linien) in Gehirn und Hypophyse der Ratte.

Die Extrakte der verschiedenen Gewebe wurden auf einer Sephadex G-50 superfine-Säule (0.9 x 90 cm) mit 15% (v/v) Essigsäure als Elutionspuffer chromatographiert. In Aliquots der Fraktionen wurden immunoreaktives Rimorphin und immunoreaktives Dynorphin (mit einem Antiserum gegen Dynorphin<sub>1-17</sub>) radioimmunologisch bestimmt (für Details: siehe Methoden)

$V_0$  = Ausschlußvolumen (Rinderserumalbumin);  $V_T$  = Gesamtvolumen der Säule;  $B_p$ -LPH =  $\beta$ -Lipotropin (porcine); Dyn = Dynorphin, Rim. = Rimorphin.

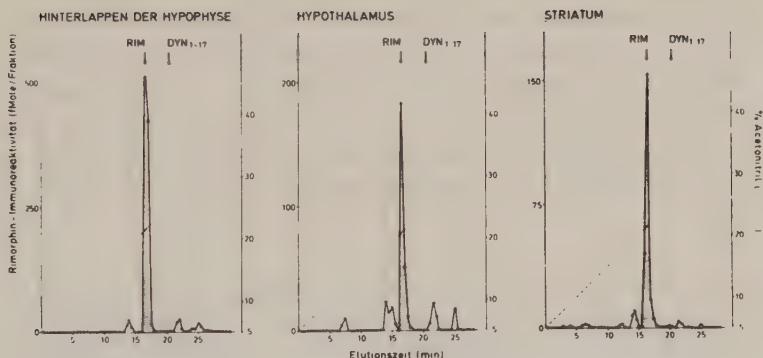


Abb. 13

Hochdrucksflüssigkeitschromatographie (HPLC) von immunoreaktivem Rimorphin aus Hypophysenhinterlappen, Hypothalamus und Striatum der Ratte nach Gelchromatographie.

Die Molekulargewichtsform von immunoreaktivem Rimorphin aus den verschiedenen Geweben, die in der Gelchromatographie jeweils in Position von synthetischem Rimorphin wanderte (siehe Abb. 12), wurde auf einer HPLC C 18 reverse phase Säule mit Puffersystem I chromatographiert. Die HPLC-Fraktionen wurden anschließend mit einem Rimorphin-Radioimmunoassay analysiert (für Puffersystem I und genaue Bedingungen der HPLC-Analyse: siehe Legende zu Abb. 7 und Methoden).

Rimorphin-Antiserum zusätzlich zum Tridecapeptid selbst v. a. im Hypothalamus noch 2 höhermolekulare Komponenten mit Molekulargewichten von etwa 6000 und 3200 (schraffierte Areale). Diese beiden Formen wurden, wie die durchbrochenen Linien in Abb. 13 demonstrieren, auch von Antiseren gegen Dynorphin<sub>1-17</sub> erkannt. Wie bereits im Absatz "Dynorphin" ausgeführt, ergaben HPLC-Analysen der 3200 Dalton Form (Gipfel 2) die Identität dieses Peptids mit Dynorphin<sub>1-32</sub>,

einem Opioid-Peptid, das am N-Terminus die Sequenz von Dynorphin<sub>1-17</sub> und am C-Terminus die Sequenz von Rimorphin enthält.

Die 6000 Dalton-Komponente stellt darüber hinaus ein weiteres gemeinsames Vorläuferpeptid von Dynorphin und Rimorphin dar. Im Gegensatz zu allen anderen Geweben besteht im Vorderlappen der Hypophyse, wie im Falle von ir-Dynorphin, die gesamte Rimorphin-Immunoreaktivität ausschließlich aus dieser (diesen) 6000 Dalton-Komponente(n); authentisches Rimorphin kommt in dieser Drüse offenbar nicht vor (siehe Abb. 13).

Tabelle I, Spalte 3, und Abb. 4 zeigen die regionalen Konzentrationen von ir-Rimorphin in Hirn- und Hypophysenarealen der Ratte. Mit Ausnahme des Hypophysenvorderlappens beziehen sich dabei die angegebenen Konzentrationen im wesentlichen auf authentisches Rimorphin selbst (siehe oben). Im Vergleich zu anderen Opioid-Peptiden zeigt die regionale Verteilung von Rimorphin auffällige Parallelitäten v.a. zu Dynorphin<sub>1-17</sub>.

#### 4.1.3. $\alpha$ - und $\beta$ -NEO-ENDORPHIN

Das aus 10 Aminosäuren bestehende Opioid-Peptid  $\alpha$ -Neo-Endorphin wurde zuerst von Kangawa et al. (1981) aus Schweinehypothalami isoliert. Bei der Untersuchung der regionalen Verteilung von  $\alpha$ -Neo-Endorphin mit einem spezifischen Radioimmunoassay gegen dieses Peptid ergab sich, wie Tabelle I, Spalte 4, und Abb. 4 zeigen, eine auffällige Parallelität zur Verteilung von Dynorphin-Peptiden in allen untersuchten Geweben von ZNS, Hypophyse und peripheren Organen.

Aus anschließenden Analysen mittels HPLC und Gelchromatographie ging hervor, daß das in dieser Studie verwendete hoch spezifische  $\alpha$ -Neo-Endorphin-Antiserum in allen

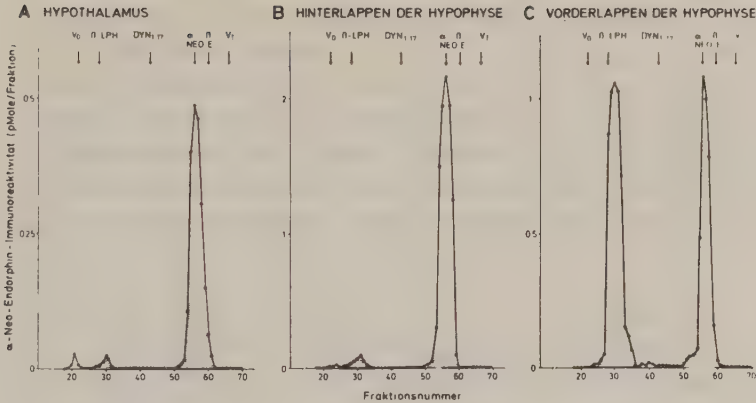


Abb. 14

Gelchromatographische Auftrennung verschiedener Molekulargewichtsformen von immunoreaktivem  $\alpha$ -Neo-Endorphin aus Hypothalamus (A), Hypophysenhinterlappen (B) und Hypophysenvorderlappen (C) der Ratte.

Die Extrakte der verschiedenen Gewebe wurden auf einer Sephadex G-50 superfine-Säule (0.9 x 90 cm) in 15% (v/v) Essigsäure chromatographiert. Die Fraktionen wurden daraufhin mit einem  $\alpha$ -Neo-Endorphin-Radioimmunoassay analysiert (für weitere Details: siehe Methoden).

$V_0$  = Ausschlußvolumen (Rinderserumalbumin);  $V_T$  = Gesamtvolumen der Säule;  $\beta$ -LPH =  $\beta$ -Lipotropin; DYN<sub>1-17</sub> = Dynorphin<sub>1-17</sub>;  $\alpha$ - $\beta$ -NEO-E =  $\alpha$ - $\beta$ -Neo-Endorphin.

Gewebe mit Ausnahme des Hypophysenvorderlappens fast ausschließlich authentisches Dekapeptid  $\alpha$ -Neo-Endorphin erkannte. Abb. 14 A und B zeigen je eine gelchromatographische Analyse von ir- $\alpha$ -Neo-Endorphin aus Hypothalamus und Hypophysenmittelhinterlappen. Die gesamte  $\alpha$ -Neo-Endorphin-Immunoreaktivität wanderte jeweils in Position von synthetischem  $\alpha$ -Neo-Endorphin.

Lediglich im Vorderlappen der Hypophyse besteht die  $\alpha$ -Neo-Endorphin-Immunoreaktivität zum großen Teil nicht aus dem Dekapeptid, sondern aus einer hochmolekularen Form mit einem ungefähren Molekulargewicht von 8000 (siehe Abb. 14C). Dieses wahrscheinliche Vorläuferpeptid von  $\alpha$ -Neo-Endorphin ist nicht identisch mit der hochmolekularen 6000 Dalton-Form, die die gesamte Dynorphin- und Rimorphin-Immunoreaktivität des Vorderlappens bildet. Auch im Falle von  $\alpha$ -Neo-Endorphin nimmt also, wie für Dynorphin und Rimorphin, der Vorderlappen der Hypophyse eine Sonderstellung ein.

$\alpha$ -Neo-Endorphin besitzt als C-terminale Aminosäure Lysin; innerhalb der Sequenz des Vorläufermoleküls Proenkephalin B folgt diesem Lysin am C-Terminus eine weitere basische Aminosäure, Arginin (siehe Abb. 1 und Abb. 2). Das natürliche Vorkommen von  $\alpha$ -Neo-Endorphin als eigenständiges Peptid steht daher mit der "klassischen" Spaltungstheorie für Vorläufermoleküle nicht im Einklang, da der C-terminale Lysin-Rest von  $\alpha$ -Neo-Endorphin nach der enzymatischen Freisetzung der  $\alpha$ -Neo-Endorphin-Sequenz aus dem Vorläufermolekül anschließend durch Carboxypeptidase B-artige Enzyme abgespalten werden müßte; d.h. es müßte das Opioid-Nonapeptid  $\beta$ -Neo-Endorphin entstehen (=  $\alpha$ -Neo-Endorphin<sub>1-9</sub>; Minamino et al., 1981).

In Anbetracht dieser Überlegungen wurden die regionalen Konzentrationen von  $\beta$ -Neo-Endorphin\* in Hirn und Hypophyse untersucht (Tabelle I, Spalte 5). Wie der Vergleich der Konzentrationen von  $\beta$ -Neo-Endorphin mit denen von  $\alpha$ -Neo-Endorphin ergab, war überraschenderweise lediglich in

---

\* Anschließende Analysen mit Gelchromatographie und HPLC ergaben, daß die vom  $\beta$ -Neo-Endorphin-RIA gemessenen Immunoreaktivitäten in Gehirn und Hypophysenmittelhirn-terlappen zum größten Teil aus authentischem Nonapeptid  $\beta$ -Neo-Endorphin bestanden. Lediglich im Vorderlappen der Hypophyse bildete das Nonapeptid nur ca. 40% der  $\beta$ -Neo-Endorphin-Gesamtimmunoreaktivität, während die restliche Immunoreaktivität in einer hochmolekularen Form nachzuweisen war. Diese hochmolekulare Form war identisch mit dem vom  $\alpha$ -Neo-Endorphin-RIA im Vorderlappen erkannten 8000 Dalton-Peptid.

der Hypophyse (Vorder- und Hinterlappen) die Konzentrationen von  $\beta$ -Neo-Endorphin annähernd so hoch wie die von  $\alpha$ -Neo-Endorphin. In allen Hirnarealen war dagegen  $\alpha$ -Neo-Endorphin das vorherrschende Peptid, in manchen Hirnarealen wie Striatum und Thalamus war dessen Konzentrationen sogar bis zu 20mal höher als die von  $\beta$ -Neo-Endorphin. Die Abspaltung des C-terminalen Lysin-Restes von  $\alpha$ -Neo-Endorphin und die damit verbundene Entstehung von  $\beta$ -Neo-Endorphin erfolgt in den meisten Geweben nicht oder nur zu einem geringen Teil. Dieses Beispiel entspricht wiederum nicht der "klassischen" Spaltungstheorie.

#### 4.2. Modulation von hypophysären Dynorphin und $\alpha$ -Neo-Endorphin im Vergleich zu anderen (Opioid)-Peptiden

Immunohistochemische Untersuchungen ergaben, daß ir-Dynorphin und ir- $\alpha$ -Neo-Endorphin, sowie ir-Leu-Enkephalin innerhalb des Hypophysenmittelhinterlappens in Nervenfasern enthalten sind, die von magnozellularen Neuronen des Hypothalamus aus in den Hypophysenhinterlappen projizieren; dabei sind diese Opioid-Peptide in denselben Zellen wie das neurosekretorische Hormon Vasopressin lokalisiert (Weber et al., 1982a; Watson et al., 1982; Martin und Voigt, 1981).

Daher lag es nahe, die Regulationmechanismen der Freisetzung von hypophysärem Dynorphin und  $\alpha$ -Neo-Endorphin mit denen von Vasopressin zu vergleichen. Im Hinblick auf mögliche biologische Funktionen von Dynorphin und  $\alpha$ -Neo-Endorphin im Vergleich zu anderen hypophysären Opioid-Peptiden war auch die gleichzeitige Bestimmung anderer Opioid-Peptide, v.a. von  $\beta$ -Endorphin von Interesse.

##### 4.2.1. In vitro Freisetzung aus isolierten Hypophysenmittelhinterlappen

Abb. 15 zeigt die gemeinsame in vitro Freisetzung von ir-Dynorphin und ir- $\alpha$ -Neo-Endorphin aus isolierten

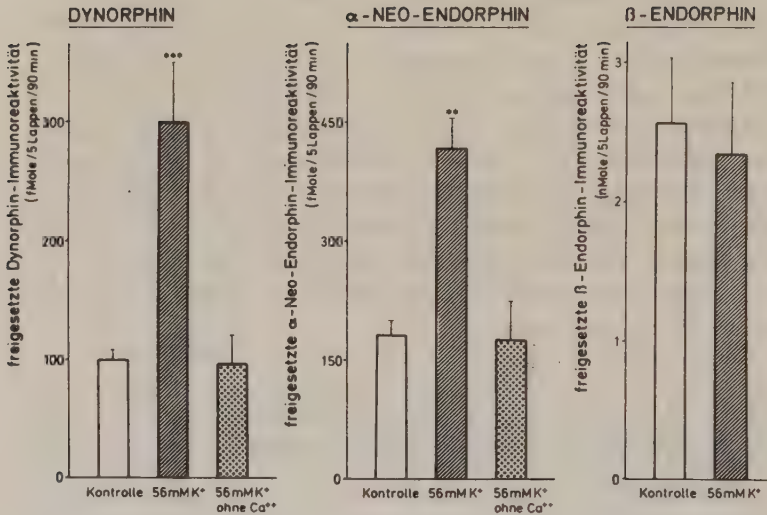


Abb. 15

In vitro Freisetzung von immunoreaktivem Dynorphin, α-Neo-Endorphin und β-Endorphin aus isolierten Hypophysenmittelhinterlappen von Ratten.

Jeweils 5 isolierte Mittelhinterlappen wurden im Ringer-Medium inkubiert und die Freisetzung der Peptide unter verschiedenen Bedingungen (K<sup>+</sup>-Stimulierung und Ca<sup>2+</sup>-Abhängigkeit) untersucht (für Details siehe: Methodenteil). Die Balken repräsentieren jeweils Mittelwerte und Standardfehler von 8 unabhängigen Freisetzungsversuchen. \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001 (Student's t-Test).

Mittelhinterlappen von Rattenhypophysen. Die Freisetzung beider Peptide konnte in Ca<sup>2+</sup>-abhängiger Weise durch 56 mM K<sup>+</sup> stimuliert werden. Dieser Mechanismus wurde bereits für eine Reihe von Hormonen, wie z.B. Vasopressin, aber auch für Neurotransmitter beschrieben (Dreifuß, 1975; Mulder et al., 1975).

Im Gegensatz zu Dynorphin und α-Neo-Endorphin war, wie Abb. 15 zeigt, die in vitro Freisetzung von ir-β-Endorphin nicht durch K<sup>+</sup> stimulierbar. Die Freisetzung

von  $\beta$ -Endorphin - das nicht wie Dynorphin und  $\alpha$ -Neo-Endorphin im Hinterlappen, sondern im Mittellappen der Hypophyse lokalisiert ist (Bloom et al., 1977) - steht hier unter tonischer dopaminerger Hemmung (Baumgarten et al., 1972; Usategui et al., 1976; Giraud et al., 1980; Höllt et al., 1982a). Gleichzeitige  $K^+$ -induzierte Stimulation der Freisetzung von Dopamin aus dem Hypophysenmittellappen mag erklären, warum die  $\beta$ -Endorphin Freisetzung nicht durch  $K^+$  stimuliert werden konnte.

#### 4.2.2. Effekte von Dehydratation, Dexamethasonbehandlung und Adrenalektomie

Die unmittelbare Untersuchung der Freisetzung von ir-Dynorphin und ir- $\alpha$ -Neo-Endorphin aus isolierten Hypophysenlappen in vitro stößt aufgrund der relativ kleinen Konzentrationen dieser Peptide, sowie aufgrund ihres hohen Adsorption an Glas und Plastikmaterial (Ghazarossian et al., 1980) auf große technische Probleme. Die Frage nach der Regulation der Freisetzung dieser Opioid-Peptide wurde daher auf indirektem Wege über die Bestimmung von Konzentrationsveränderungen im Hypophysenmittelhinter- und -vorderlappen nach experimenteller Manipulation an intakten Ratten zu beantworten versucht.

Die Erhöhung der extrazellulären Osmolarität stellt bekanntlicherweise einen starken Reiz für die Freisetzung von Vasopressin aus dem Hypophysenhinterlappen dar. Wie Abb. 16 zeigt, führte Dehydratation durch Zufuhr einer 2%-igen Kochsalzlösung für 5 Tage bei den Ratten zu einer fast vollständigen Entleerung des Hypophysenmittelhinterlappens an ir-Vasopressin. Dieser Stimulus bewirkte ebenfalls eine starke Abnahme der Gewebespiegel von ir-Dynorphin, ir- $\alpha$ -Neo-Endorphin und ir-Leu-Enkephalin in dieser Struktur. Im Gegensatz dazu blieben im Vorderlappen die Konzentrationen von ir-Dynorphin und ir- $\alpha$ -Neo-Endorphin unverändert. Auch die Gewebespiegel von ir- $\beta$ -Endorphin im Vorder- und

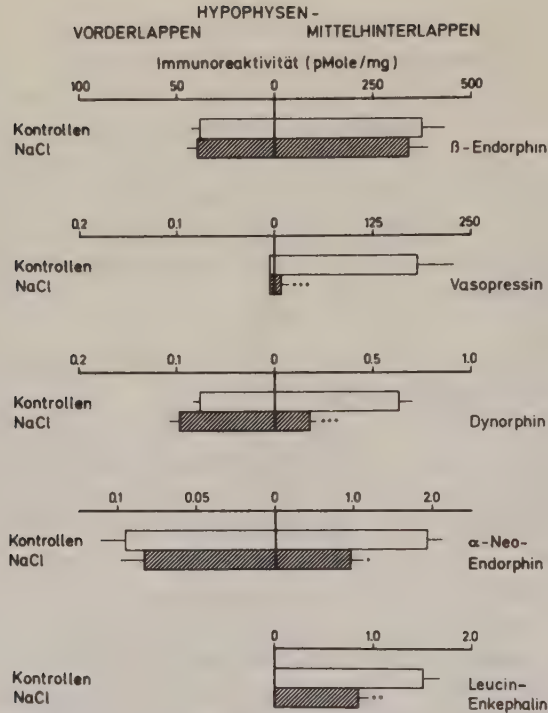


Abb. 16

Peptide im Mittelhinterlappen und Vorderlappen der Hypophyse nach Dehydrierung von Ratten durch orale Zufuhr einer 2%igen Kochsalzlösung. Ratten erhielten entweder normales Trinkwasser (offene Balken) oder eine 2%ige Kochsalzlösung (schraffierte Balken) für 5 Tage zu trinken. In den Extrakten der Hypophysenlappen beider Gruppen wurden immunoreaktives Dynorphin<sub>1-17</sub>,  $\alpha$ -Neo-Endorphin, Leu-Enkephalin, Vasopressin und  $\beta$ -Endorphin radioimmunologisch bestimmt. Die Werte repräsentieren Mittelwerte und Standardfehler von Doppelbestimmungen aus jeweils 6 Hypophysenlappen. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$  (Student's t-Test) (für weitere Details: siehe Methoden).

Mittelhinterlappen blieben konstant.

Abb. 17 zeigt den Effekt chronischer Dexamethasonbehandlung von Ratten (orale Zufuhr einer 0.002% Dexametha-

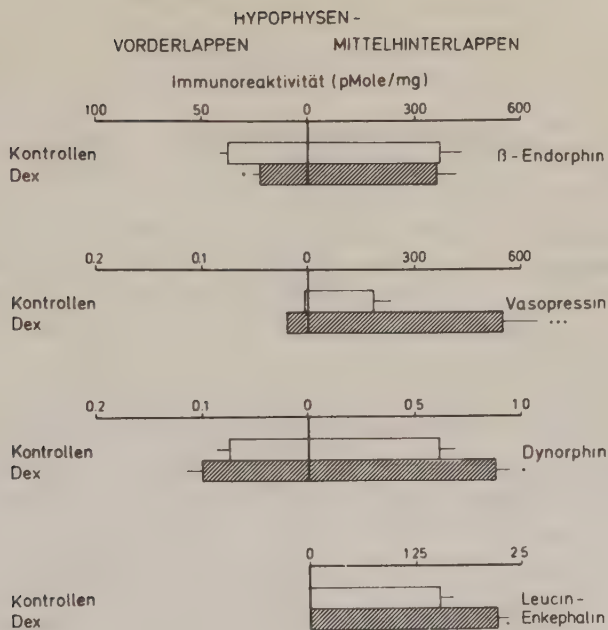


Abb. 17

Effekte chronischer Dexamethasonbehandlung von Ratten auf die Gewebespiegel von Hypophysenpeptiden.

Eine Gruppe von Ratten erhielt über 5 Tage Dexamethason ins Trinkwasser (20 µg/ml) (schraffierte Balken), während die Kontrollgruppe normales Trinkwasser erhielt (offene Balken). In den Extrakten von Hypophysenvorderlappen und Hypophysenmittelhinterlappen wurde immunoreaktives Dynorphin<sub>1-17</sub>, Leu-Enkephalin, Vasopressin und β-Endorphin radioimmunologisch bestimmt. Die Werte repräsentieren Mittelwerte und Standardfehler von Doppelbestimmungen aus jeweils 6 Hypophysenlappen). \*p<0.05; \*\*\*p<0.001 (Student's t-Test) (für weitere Details: siehe Methoden).

sonlösung über 5 Tage) auf die Gewebespiegel hypophysärer Peptide. Dabei stiegen die Konzentrationen von ir-Vasopressin,

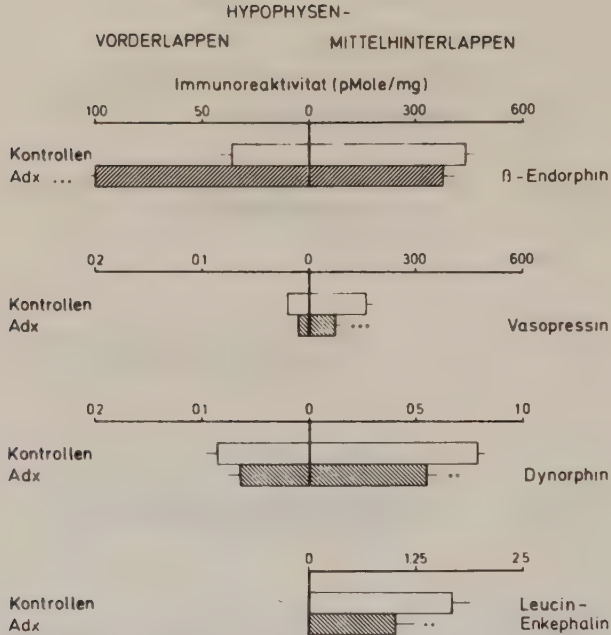


Abb. 18

Effekte von Adrenalektomie auf die Gewebespiegel von Peptiden der Rattenhypophyse. 14 Tage nach bilateraler Adrenalektomie (schraffierte Balken), bzw. nach Scheinoperation von Kontrollratten (offene Balken) wurden die Gewebespiegel von immunoreaktivem Dynorphin<sub>1-17</sub>, Leu-Enkephalin, Vasopressin und  $\beta$ -Endorphin im Mittelhinterlappen und Vorderlappen der Hypophyse radioimmunologisch untersucht (für weitere Details: siehe Methoden).

ir-Dynorphin und ir-Leu-Enkephalin im Hypophysenhinterlappen stark an. Glucocorticoide beeinflussen also gleichsinnig die Gewebespiegel dieser 3 Peptide im Hinterlappen. Im Gegensatz dazu blieb ir-Dynorphin im Vorderlappen der Hypophyse konstant, jedoch verminderte sich die Konzentration von ir- $\beta$ -Endorphin deutlich.

Wie aus Abb. 18 hervorgeht, konnten 14 Tage nach bilateraler Adrenalektomie von Ratten Effekte auf die Konzentration hypophysärer Peptide erzielt werden, die zu den Effekten chronischer Dexamethasonbehandlung spiegelbildlich waren.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß den verschiedenen Manipulationen (Dehydratation, Dexamethasonbehandlung und Adrenalektomie) eines gemeinsam war: Sie führten zu einer gleichsinnigen Modulation der Gewebespiegel von ir-Dynorphin/ir- $\alpha$ -Neo-Endorphin/ir-Leu-Enkephalin und Vasopressin im Hinterlappen der Hypophyse.

Die Modulation von ir-Dynorphin und ir- $\alpha$ -Neo-Endorphin des Hypophysenhinterlappens war aber jeweils unterschiedlich zur Modulation von ir-Dynorphin und ir- $\alpha$ -Neo-Endorphin im Hypophysenvorderlappen, sowie zur Modulation von ir- $\beta$ -Endorphin im Mittel- und Vorderlappen der Hypophyse.

#### 4.2.3. Opioid-Peptide in Brattleboro-Ratten

Homozygote Brattleboro-Ratten bilden einen Rattenstamm mit hereditärem zentralen Diabetes insipidus. Sie sind also unfähig zur Synthese von Vasopressin. Wie Tabelle II zeigt, ist Vasopressin im Hypophysenhinterlappen folglich nicht nachzuweisen, im Gegensatz zu heterozygoten Kontrolltieren. Allerdings besitzen homozygote Brattleboro-Ratten im Vergleich zu den heterozygoten Kontrollen unveränderte Gewebespiegel von ir-Dynorphin, ir- $\alpha$ -Neo-Endorphin und ir-Leu-Enkephalin.

TABELLE II

|                                   | homozygote<br>Brattleboro-<br>Ratten | heterozygote<br>Kontroll-<br>ratten |
|-----------------------------------|--------------------------------------|-------------------------------------|
| DYNORPHIN<br>pMol/g               | 840 $\pm$ 240                        | 570 $\pm$ 80                        |
| $\alpha$ -NEO-ENDORPHIN<br>pMol/g | 1870 $\pm$ 280                       | 1690 $\pm$ 95                       |
| LEU-ENKEPHALIN<br>pMol/g          | 1230 $\pm$ 260                       | 1490 $\pm$ 270                      |
| VASOPRESSIN<br>nMol/g             | nicht<br>nachweisbar***              | 227 $\pm$ 74                        |
| $\beta$ -ENDORPHIN<br>nMol/g      | 380 $\pm$ 43                         | 438 $\pm$ 56                        |

Gewebespiegel von Peptiden in der Hypophyse von Brattleboro-Ratten.

Die Gewebespiegel von immunoreaktivem Dynorphin 1-17,  $\alpha$ -Neo-Endorphin, Leu-Enkephalin, Vasopressin und  $\beta$ -Endorphin wurden in Hypophysenmittelhinterlappen und Hypophysenvorderlappen von homozygoten Brattleboro-Ratten, sowie von heterozygoten Kontrollratten radioimmunologisch bestimmt. Homozygote Brattleboro-Ratten besitzen einen zentralen Diabetes insipidus und sind daher nicht in der Lage, Vasopressin zu synthetisieren.

Die Balken repräsentieren Mittelwerte und Standardfehler von Doppelbestimmungen aus je 3 Hypophysenlappen. \*\*\* $p < 0.001$  (Student's t-Test)

## 5. DISKUSSION

### 5.1. Die regionale Verteilung des Proenkephalin B-Systems im Vergleich zu anderen Opioid-Peptid-Systemen

Die vorliegenden Untersuchungen zeigen eine weite Verteilung verschiedener Formen der Opioid-Peptide Dynorphin, Rimorphin und  $\alpha$ -Neo-Endorphin, die aus einem gemeinsamen Vorläufermolekül, Proenkephalin B (Kakidani et al., 1982) stammen. Opioid-Peptide des Proenkephalin B-Systems sind in höchster Konzentration im Hypophysenhinterlappen nachzuweisen, wo sie in magnozellulären Neuronen eines hypothalamo-hypophysären Systems lokalisiert sind; sie sind aber auch im Vorderlappen der Hypophyse, in den meisten Hirnarealen, im Rückenmark, Gastrointestinaltrakt, in der Lunge und in den Ganglien des sympathischen Nervensystems zu finden (die vorliegenden Untersuchungen, Weber et al., 1982a; Watson et al., 1981, 1982).

Die weite regionale Verteilung des Proenkephalin B-Systems ähnelt der des Proenkephalin A-Systems (aus dem Met-Enkephalin stammt). Obgleich Peptide des Proenkephalin A- und B-Systems von unterschiedlichen Vorläufermolekülen abstammen, überlappt ihre Verteilung in vielen Strukturen (Weber et al., 1982a). Dabei scheint es sogar Neurone zu geben, die beide Opioid-Peptid-Systeme enthalten, z.B. im Nucleus accumbens, Hypothalamus, Hippocampus und Rückenmark (Weber et al., 1982a). Andere Neurone enthalten dagegen nur jeweils eines dieser beiden Systeme; so sind beispielsweise in den Vasopressin-produzierenden magnozellulären Neuronen des hypothalamo-hypophysären Systems nur Opioid Peptide des Proenkephalin B-Systems nachweisbar (Martin und Voigt, 1981; Weber et al., 1982a; Watson et al., 1982).

Im Gegensatz zum Proenkephalin A- und B-System ist die Verteilung des Proopiomelanocortin-Systems (aus dem  $\beta$ -Endorphin und ACTH hervorgehen) auf wesentlich weniger Strukturen

beschränkt. Die Peptide des Proopiomelanocortin-Systems sind vor allem im Vorderlappen und Mittellappen der Hypophyse besonders hoch konzentriert, von wo aus sie als Hormone in den peripheren Blutkreislauf ausgeschüttet werden. Sie sind nicht wie die Peptide des Proenkephalin B-Systems im Hinterlappen der Hypophyse nachweisbar. Im Gehirn wurden Peptide des Proopiomelanocortin-Systems in Zellen innerhalb und in der Umgebung des Nucleus arcuatus im Hypothalamus lokalisiert. Axone dieser Zellen projizieren in die Eminencia mediana, in die Amygdala und in das periaqueductale Hohlengrau des Mittelhirns (Bloom et al., 1978).

## 5.2. Charakterisierung, Identifizierung und mögliche Bedeutung verschiedener Opioid-Peptide des Proenkephalin B-Systems

Um die regionale Verteilung und Konzentration eines Peptides in verschiedenen Geweben bestimmen zu können, genügt alleinige radioimmunologische oder immunohistochemische Bestimmung des Peptids in der Regel nicht, da von den dabei verwendeten Antisera häufig nicht nur die jeweiligen Peptide, sondern auch dessen Vorläuferformen und enzymatische Abbauprodukte mit erkannt werden. Ebenso unterscheiden Antisera oft nicht, ob ein Peptid im Gewebe eine Modifikation erfahren hat. Derartige Modifikationen (z.B. Acetylierung oder Amidierung) spielen, wie später noch dargelegt wird, mitunter eine erhebliche Rolle für die biologische Aktivität von Peptiden. Andererseits bietet aber gerade diese relative "Unspezifität" von Antisera die Möglichkeit, wichtige Modifikationen bekannter Opioid-Peptide aufzudecken; diese können dann, in Kombination mit anderen Techniken, identifiziert werden; dies wird hier am Beispiel des neuen Opioid-Oktapeptids Dynorphin<sub>1-8</sub> dargestellt. Zu einer genaueren Charakterisierung der verschiedenen Opioid-Peptide des Proenkephalin B-Systems wurden deshalb in dieser Untersuchung immunologische Methoden mit einer Reihe von

chromatographischen Trennungsv erfahren, enzymatische Techniken und biologischen Testsystemen kombiniert.

#### 5.2.1. Dynorphin<sub>1-17</sub> und Vorläuferpeptide

Im Zentralnervensystem, Hypophysenhinterlappen, Gastrointestinaltrakt und Lunge konnten jeweils 4 verschiedene Formen von Dynorphin mit unterschiedlichen Molekulargewichten charakterisiert und 3 von diesen dann identifiziert werden. Neben dem Heptadecapeptid Dynorphin<sub>1-17</sub> selbst erkannten die Dynorphin-Antiseren noch zwei höhermolekulare Formen mit Molekulargewichten von etwa 6000 und 3200, die sich als gemeinsame Vorläufermoleküle der beiden Opioid-Peptide Dynorphin<sub>1-17</sub> und Rimorphin erwiesen. Das Peptid mit einem ungefähren Molekulargewicht von 3200 konnte als Dynorphin<sub>1-32</sub> identifiziert werden. Dynorphin<sub>1-32</sub>, ursprünglich von Fischli et al., (1982) aus Schweinehypophysen isoliert, besitzt am N-Terminus die Sequenz von Dynorphin<sub>1-17</sub> und am C-Terminus die von Rimorphin; beide Opioid-Peptide sind durch die typische Spaltungssequenz zweier basischer Aminosäuren miteinander verbunden.

#### 5.2.2. Dynorphin<sub>1-8</sub> - ein neues endogenes Opioid-Peptid

Darüber hinaus konnte als kleinstmolekulare Form von Dynorphin Dynorphin<sub>1-8</sub> identifiziert werden, ein neues endogenes Opioid-Peptid, bestehend aus den 8 N-terminalen Aminosäuren von Dynorphin<sub>1-17</sub> (siehe Abb. 1). Parallel zu unserer Arbeit (Seizinger et al., 1981b) gelang Minamino et al. (1980) die Isolierung von Dynorphin<sub>1-8</sub> aus Schweinehypothalami. Wie die vorliegenden Untersuchungen zeigen, ist Dynorphin<sub>1-8</sub> vor allem im Gehirn die dominierende Form von Dynorphin. In manchen Hirnarealen, z.B. im Striatum und im Thalamus sind die Konzentrationen von Dynorphin<sub>1-8</sub> bis zu 10-fach höher als die von Dynorphin<sub>1-17</sub>. Die hohen Konzentrationen von Dynorphin<sub>1-8</sub> in manchen Arealen sind bemerkenswert, weil die enzymatische Abspaltung von Dynorphin<sub>1-8</sub> aus

seinem Vorläuferpeptid (Dynorphin<sub>1-17</sub>) nicht an einer für (Opioid-)Peptide typischen Spaltungssequenz zweier basischer Aminosäuren erfolgt (siehe Abb. 1 und 2).

Corbett und Mitarbeiter (1982) konnten vor kurzem zeigen, daß die Wirkungsdauer von Dynorphin<sub>1-8</sub> am Kappa-Opiat-rezeptor wesentlich kürzer ist als die von Dynorphin<sub>1-17</sub>. Dies wird auf den schnelleren Abbau von Dynorphin<sub>1-8</sub> durch Peptidasen zurückgeführt. Sie formulierten daraus die These, daß Dynorphin<sub>1-8</sub> vorwiegend als Neurotransmitter- oder Neuromodulator, Dynorphin<sub>1-17</sub> aber eher als Hormon wirkt. Dies steht in Einklang mit dem hier erhobenen Befund, daß Dynorphin<sub>1-8</sub> vorwiegend im Gehirn, Dynorphin<sub>1-17</sub> und höhermolekulare opiatartige Formen davon vorwiegend in der Hypophyse gefunden werden.

### 5.2.3. Die Bedeutung der $\alpha$ -N-Acetylierung

Peptide können nach ihrer enzymatischen Freisetzung aus der Vorläufersequenz zusätzlich einer N- oder C-terminalen Modifikation unterzogen werden. Derartige Modifikationen, z.B. Acetylierung und Amidierung haben mitunter erhebliche Bedeutung für die biologische Aktivität von Peptiden. So sind beispielsweise die N-terminale Acetyl-Gruppe und die C-terminale Amid-Gruppe des  $\alpha$ -Melanozyten-stimulierenden Hormons ( $\alpha$ -MSH) für die melanotrope Aktivität dieses Peptids von essentieller Bedeutung. Die N-terminale Modifikation von Peptiden durch  $\alpha$ -N-Acetylierung hat in jüngster Zeit große Bedeutung für Opioid-Peptide erlangt, denn sie bewirkt einen völligen Verlust der Opiateigenschaften von Opioid-Peptiden (Smyth et al., 1979; Seizinger et al., 1981a). Der überwiegende Teil von  $\beta$ -Endorphin und ein Teil von Leu-Enkephalin in der Hypophyse liegen in dieser  $\alpha$ -N-acetylierten, d.h. opiat-inaktiven Form vor (Smyth et al., 1979; Zacharian und Smyth, 1980; Seizinger und Höllt, 1980, 1982; Seizinger et al., 1981a; Eipper und Mains, 1981). Da alle bisher bekannten endogenen Opioid-Peptide dieselbe N-terminale

Aminosäuresequenz (Tyr-Gly-Gly-Phe) besitzen, an der die Acetylierung erfolgt, ist es denkbar, daß auch Opioid-Peptide des Proenkephalin B-Systems  $\alpha$ -N-acetyliert werden. Die vorliegenden Untersuchungen zeigen aber, daß die verschiedenen Dynorphin-Formen im Hypophysenhinterlappen - im Gegensatz zu  $\beta$ -Endorphin und Leu-Enkephalin - nicht  $\alpha$ -N-acetyliert sind, d.h. nicht inaktiviert werden. Untersuchungen an Rimorphin und  $\alpha$ -Neo-Endorphin zeigten ebenfalls, daß diese Peptide nicht  $\alpha$ -N-acetyliert sind (Seizinger, in Vorbereitung). Diese Ergebnisse sind auch deshalb von Bedeutung, weil Opioid-Peptiden eine Funktion in der Regulation der Freisetzung von Vasopressin und Oxytocin aus dem Hypophysenhinterlappen zugesprochen wird (Iversen et al., 1980; Bicknell und Leng, 1982).

#### 5.2.4. Rimorphin

Das Tridecapeptid Rimorphin ist innerhalb der Sequenz seines Vorläufermoleküls Proenkephalin B am C-Terminus nicht von der typischen Spaltungssequenz zweier basischer Aminosäuren flankiert (siehe Abb. 2 und Einleitung). Daher wurde von Kakidani et al. (1982) und von Rossier (1982) vermutet, daß nicht Rimorphin selbst, sondern eine bis zum C-terminalen Ende von Proenkephalin B verlängerte größere Rimorphin-Form als "natürliches" enzymatisches Spaltprodukt dieses Vorläufermoleküls entstehen müßte (siehe Abb. 2). Unsere Untersuchungen zeigen aber, daß in allen Hirnarealen und im Hypophysenhinterlappen das authentische Tridecapeptid Rimorphin - nicht aber die C-terminal verlängerte Form von Rimorphin - dominiert. Rimorphin, das in etwa ähnlich hohen Konzentrationen wie Dynorphin<sub>1-17</sub> vorkommt, ist damit als ein endogenes Opioid-Peptid in neuralem Gewebe anzusehen. Ähnlich wie Dynorphin<sub>1-8</sub> wird es innerhalb der Sequenz des Vorläufermoleküls am C-Terminus nur von einer einzigen basischen Aminosäure (Arginin) flankiert.

#### 5.2.5. Die Sonderstellung des Hypophysenvorderlappens

Im Gegensatz zu sämtlichen anderen Geweben besteht im Vorderlappen der Hypophyse die gesamte Dynorphin- und Rimorphin-Immunoreaktivität aus einem beiden Opioid-Peptiden gemeinsamen hochmolekularen Vorläuferpeptid mit einem Molekulargewicht von etwa 6000. Dieses Peptid besteht wahrscheinlich aus den 48 C-terminalen Aminosäuren des Proenkephalin B-Vorläufermoleküls. Es besitzt damit die Dynorphin-Sequenz an seinem N-Terminus (weshalb es noch opiataktiv ist) und die Sequenz von Rimorphin in seinem mittleren Teil (siehe Abb. 2). Weder das Tridecapeptid Rimorphin noch Dynorphin<sub>1-8</sub>, <sub>1-17</sub>, oder <sub>1-32</sub> waren im Hypophysenvorderlappen nachzuweisen; dies läßt auf eine selektive proteolytische Spaltung von Proenkephalin B im Vorderlappen schließen.

Interessanterweise entstehen auch aus einem anderen Opioid-Peptid-Vorläufermolekül, dem Proopiomelanocortin, im Vorderlappen der Hypophyse hauptsächlich die höhermolekularen Formen  $\beta$ -Lipotropin und Adrenocorticotropes Hormon (ACTH<sub>1-39</sub>) während in anderen Geweben diese beiden Peptide vollständig weiter in  $\beta$ -Endorphin und ACTH<sub>1-13</sub> (bzw.  $\alpha$ -N-acetyl- $\beta$ -Endorphin und  $\alpha$ -MSH) gespalten werden (Mains et al., 1977; Crine et al., 1978; Mains und Eipper, 1979; Seizinger und Höllt, 1980, 1982; Gramsch et al., 1980). Dabei erfüllen die höhermolekularen Formen des Vorderlappens offensichtlich andere biologische Funktionen als die kleineren Formen im Hypophysenmittellappen und im Gehirn. So stimuliert ACTH<sub>1-39</sub> als Hormon beispielsweise die Synthese von Corticosteroiden in den Nebennieren, während ACTH<sub>1-13</sub> und  $\beta$ -Endorphin im Gehirn wahrscheinlich lokale Neurotransmitter- oder Neuromodulatorfunktionen besitzen (Garren et al., 1971; Gramsch et al., 1980). Es ist daher durchaus denkbar, daß auch die hochmolekulare Form von Dynorphin und Rimorphin im Vorderlappen eigene biologische Signifikanz besitzt, unterschiedlich von der Funktion der beiden kleineren Opioid-Peptide.

#### 5.2.6. $\alpha$ -Neo-Endorphin und $\beta$ -Neo-Endorphin

Bei der Untersuchung der regionalen Verteilung des Opioid-Deka-peptids  $\alpha$ -Neo-Endorphin ergab sich eine auffällige Parallelität zur Verteilung von Dynorphin-Peptiden in praktisch allen untersuchten Geweben des Zentralnervensystems, der Hypophyse und in peripheren Organen. Die mit Abstand höchsten Konzentrationen konnten wiederum im Hypophysenhinterlappen, innerhalb des Gehirns im Hypothalamus und im Striatum nachgewiesen werden. Aus diesen Befunden ergaben sich bereits vor der Aufklärung der Sequenz von Proenkephalin B starke Hinweise auf die Existenz eines gemeinsamen Vorläufermoleküls für die beiden Opioid-Peptide  $\alpha$ -Neo-Endorphin und Dynorphin. Sie wurden durch auffällige Parallelitäten in der Regulation beider Opioid-Peptide (die vorliegende Untersuchung), in der parallelen ontogenetischen Entwicklung (Seizinger et al., 1982b), sowie durch immunohistochemische Untersuchungen (Weber et al., 1982a) gestützt. Auch im Falle von  $\alpha$ -Neo-Endorphin nimmt der Vorderlappen der Hypophyse wieder eine Sonderstellung ein, da lediglich in diesem Gewebe die  $\alpha$ -Neo-Endorphin-Immunoreaktivität nicht ausschließlich aus dem authentischen Deka-peptid, sondern zu über 50% aus einer hochmolekularen Vorläuferform mit einem ungefähren Molekulargewicht von 8000 besteht. Diese hochmolekulare Form ist aber weder identisch mit 6000 Dalton-Dynorphin/Rimorphin, noch enthält sie dessen Sequenz.

$\alpha$ -Neo-Endorphin, das als C-terminale Aminosäure Lysin besitzt, ist innerhalb der Proenkephalin B-Sequenz am C-Terminus von einer weiteren basischen Aminosäure (Arginin) gefolgt (siehe Abb. 2). Diese Aufeinanderfolge von Lysin und Arginin stellt, wie bereits ausgeführt, eine "klassische" Spaltungssequenz für Peptid-Vorläufermoleküle dar. Demnach dürfte  $\alpha$ -Neo-Endorphin überhaupt nicht existieren, da der C-terminale Lysin-Rest von  $\alpha$ -Neo-Endorphin nach seiner Freilegung durch Trypsin-artige Enzyme anschließend durch Carboxypeptidase-B-artige Enzyme abgespalten werden müßte. Die

Abspaltung des C-terminalen Lysin-Restes von  $\alpha$ -Neo-Endorphin führt zur Bildung des Opioid-Nonapeptides  $\beta$ -Neo-Endorphin (siehe Abb. 1). (Daher wurde Proenkephalin B auch als " $\beta$ -Neo-Endorphin/Dynorphin-precursor" (Kakidani et al., 1982) bezeichnet.)

Wie die vorliegenden Untersuchungen ergaben, erreichten aber die Konzentrationen von  $\beta$ -Neo-Endorphin nur im Hypophysenvorder- und -hinterlappen annähernd die Konzentrationen von  $\alpha$ -Neo-Endorphin. Alle Hirnareale enthielten dagegen wesentlich mehr - im Striatum und Thalamus nahezu 20mal mehr -  $\alpha$ -Neo-Endorphin als  $\beta$ -Neo-Endorphin. In den meisten Geweben erfolgt also entgegen der "klassischen" Spaltungstheorie keine oder nur geringe Abspaltung des C-terminalen Lysin-Restes von  $\alpha$ -Neo-Endorphin. Dieses zunächst erstaunliche Ergebnis wird aber dadurch verständlicher, daß der abzuspalten- de Lysin-Rest in Position 10 von  $\alpha$ -Neo-Endorphin der Aminosäure Prolin benachbart ist. Es ist bekannt, daß Peptidasen in der Regel nicht in der Lage sind, Peptidbindungen, an denen Prolin beteiligt ist, aufzuspalten (Walter et al., 1971; Young et al., 1968). Es bedarf dazu spezifischer Enzyme; eines davon konnte im Hirn nachgewiesen werden (Hersh et al., 1979). Die in verschiedenen Arealen stark unterschiedlichen Konzentrationsverhältnisse von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Neo-Endorphin (1:1 bis 20:1) läßt auf eine selektive Verteilung oder Aktivität solcher Prolinbindungen spaltender Enzyme schließen.

### 5.3. Die Bedeutung der selektiven enzymatischen Spaltung von Proenkephalin B

Wie die vorliegenden Untersuchungen zeigen, enthalten verschiedene Gewebe höchst unterschiedliche Konzentrationen der verschiedenen zum Proenkephalin B-System gehörigen Opioid-Peptide. Dies läßt auf eine selektive, gewebespezifische enzymatische Spaltung des Vorläufermoleküls Proenkephalin B schließen.

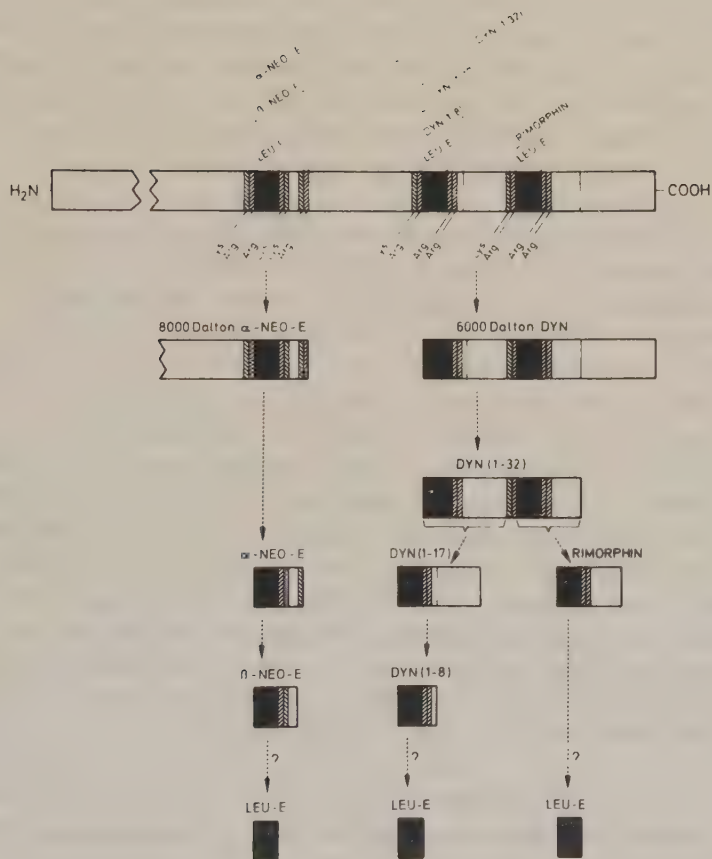


Abb. 19

Schematische Darstellung der möglichen enzymatischen Spaltung des Opioid-Peptid-Vorläufermoleküls Proenkephalin B. Für Erklärungen siehe Text. DYN = Dynorphin; α-/β-NEO-E = α-/β-Neo-Endorphin; LEU-E = Leu-Enkephalin; Sequenzen mit 2 basischen Aminosäuren sind eingezeichnet (Lys = Lysin; Arg = Arginin).

Abb. 19 zeigt ein Modell der möglichen proteolytischen Spaltungswege, des sog. Processing von Proenkephalin B.

(Soweit wie möglich wurden dabei die jeweiligen Spezifitäten der bei den Einzelanalysen verwendeten Antiseren berücksichtigt. Es ist aber theoretisch denkbar, daß weitere Intermediärprodukte existieren, die Dynorphin-, Rimorphin- oder  $\alpha$ -Neo-Endorphin-Sequenzen enthalten, aber nicht von den bei diesen Versuchen verwendeten Antiseren erkannt wurden.)

Die unterschiedliche enzymatische Ausstattung verschiedener Gewebe bewirkt ein unterschiedliches Processing von Proenkephalin B. So erfolgt beispielsweise im Striatum die enzymatische Spaltung des 30 000 Dalton-Vorläufers über 6 000 Dalton-Dynorphin/Rimorphin und Dynorphin<sub>1-32</sub> zum Tri-decapeptid Rimorphin und Dynorphin<sub>1-17</sub>, das dann schließlich größtenteils noch weiter zu Dynorphin<sub>1-8</sub> gespalten wird. Das Dekapeptid  $\alpha$ -Neo-Endorphin wird in diesem Gewebe über 8 000 Dalton- $\alpha$ -Neo-Endorphin aus Proenkephalin B freigesetzt; ein weiteres Processing zu  $\beta$ -Neo-Endorphin, wie beispielsweise im Hypophysenhinterlappen, erfolgt scheinbar im Striatum aber nicht. Dynorphin<sub>1-8</sub>, Rimorphin und  $\alpha$ -Neo-Endorphin bilden also im Striatum die Hauptendprodukte des Spaltungsweges. In wieweit noch eine weitere Spaltung bis zu Leu-Enkephalin erfolgt, ist z.Zt. nicht ganz geklärt, da Leu-Enkephalin auch aus dem Proenkephalin A Precursor stammen kann.

Diese "Processing-Kette" kann nun, je nach Gewebe, an verschiedenen Stellen gestoppt werden. Wie das Beispiel des Hypophysenvorderlappens zeigt, scheint es dabei sogar möglich zu sein, das Processing nur für einen bestimmten Teil von Proenkephalin B anzuhalten, während andere Teile einem weitergehenden Processing unterzogen werden. Dadurch ist zu erklären, daß im Vorderlappen zwar  $\alpha$ -Neo-Endorphin und  $\beta$ -Neo-Endorphin vorkommen, die Opioid-Peptid-Sequenzen von Dynorphin und Rimorphin aber in einer hochmolekularen Form, dann 6 000 Dalton-Peptid "gebunden" bleiben.

Es läßt sich im Augenblick nicht mit Sicherheit bestimmen, ob das Fehlen oder die geringen Konzentrationen bestimmte Opioid-Peptide in bestimmten Strukturen wirklich

auf geringes oder fehlendes Processing des Vorläufermoleküls in diese Peptide zurückzuführen sind, oder ob auch eine beschleunigte enzymatische Degradation dieser Peptide dabei eine Rolle spielt. Die dazu notwendigen Biosynthesestudien, wie sie beispielsweise für das Proopiomelanocortin-System der Hypophyse durchgeführt wurden (z.B. Mains et al., 1977; Seizinger und Höllt, 1980, 1982), sind jedoch bisher für das Proenkephalin B-System noch nicht gelungen, da die Peptide dieses Systems bzw. seine Syntheseaktivität im Vergleich zum hypophysären Proopiomelanocortin-System mindestens um den Faktor 100 geringer sind.

Das proteolytische Processing von Proenkephalin B ist interessanterweise nicht an die "klassischen" Spaltungssequenzen zweier basischer Aminosäuren gebunden. Den Opioid-Peptiden Dynorphin<sub>1-8</sub> und Rimorphin folgt innerhalb der Proenkephalin B-Sequenz am C-Terminus jeweils nur eine einzige basische Aminosäure (Arginin); sie werden in einer Reihe von Geweben dennoch in hohen Konzentrationen gefunden. Andererseits werden in bestimmten Geweben selbst Opioid-Peptide, die beidseits von zwei basischen Aminosäuren flankiert sind, nicht freigesetzt, wie beispielsweise Dynorphin<sub>1-17</sub> im Hypophysen-Vorderlappen. Analog zu Dynorphin<sub>1-8</sub> und Rimorphin im Proenkephalin B-Precursor folgt auch der Sequenz von Neurophysin II im Vasopressin-Neurophysin II-Precursor C-terminal lediglich ein einziges Arginin als Spaltungssignal (Land et al., 1982). Innerhalb der Opioid Peptid-Verläufermoleküle ist allerdings die enzymatische Spaltung an einer singulären basischen Aminosäure bisher nur für die Freisetzung von Dynorphin<sub>1-8</sub> und Rimorphin bekannt. Jedoch scheint das Processing auch des Proenkephalin A-Precursors nicht in allen Fällen der "klassischen" Spaltungstheorie zu entsprechen. So erfolgt beispielsweise die enzymatische Freisetzung des Opioid-Peptids BAM-22P aus Proenkephalin A durch Spaltung einer Gly-Gly-Bindung (Mizuno et al., 1980b; Noda et al., 1981).

Auch die Tatsache, daß aus Proenkephalin B nicht nur Leu-Enkephalin, sondern auch größere Leu-Enkephalin-enthaltende Opiode wie Dynorphin,  $\alpha$ -Neo-Endorphin und Rimorphin in z.T. gleich hohen oder sogar höheren Konzentrationen als Leu-Enkephalin selbst entstehen, obwohl alle drei Leu-Enkephalin-Sequenzen beidseits von je 2 basischen Aminosäuren flankiert werden, zeigt die Ergänzungsbedürftigkeit der "klassischen" Spaltungstheorie.

Dieses sehr variable Spaltungsprinzip erlaubt die selektive Freisetzung bestimmter Opioid-Peptide aus einem Prohormon, das mehrere Opioid-Peptid-Sequenzen enthält.

Das Prinzip der variablen Spaltung ist von Bedeutung in Hinblick auf Befunde, die wahrscheinlich machen, daß verschiedene Opioid-Peptide unterschiedliche biologische Funktionen haben. Die verschiedenen Opioid-Peptide des Proenkephalin B-Systems unterscheiden sich beispielsweise in ihrer Stabilität gegenüber Enzymen, wodurch sie, wie oben bereits dargelegt, eventuell unterschiedliche Funktionen als Neurotransmitter oder Hormone erhalten.

Darüber hinaus unterscheiden sie sich auch in ihren Rezeptorspezifitäten. Nach allgemeiner Auffassung lassen sich Opiatrezeptoren in (mindestens) 3 Typen klassifizieren: Mu ( $\mu$ ), Kappa ( $\kappa$ ) und Delta ( $\delta$ ) (Martin et al., 1976; Lord et al., 1977; Chang et al., 1981; Wüster et al., 1981; Corbett et al., 1982). Eine Reihe von Opioid-Peptiden des Proenkephalin B-Systems, wie z.B. Dynorphin<sub>1-17</sub>, zeigen selektive Affinität zum Kappa-Rezeptor (Wüster et al., 1980; Corbett et al., 1982; Pfeiffer et al., 1981; Chavkin et al., 1982). Leu- und Met-Enkephalin binden dagegen an den Delta-Rezeptor (Wüster et al., 1981; Corbett et al., 1982). Eine Reihe von größeren Opioid-Peptiden des Proenkephalin A-Systems, wie beispielsweise Peptid E und BAM-22P, scheinen hingegen eine gewisse Selektivität für den Mu-Rezeptor (an den auch Morphin bindet) zu besitzen (V. Höllt, persönliche Mitteilung).

Der Heterogenität der Opioid-Peptide steht also - sinnvollerweise - eine Heterogenität der Opiat-Rezeptoren gegenüber. Das selektive gewebespezifische Processing des jeweiligen Vorläufermoleküls entscheidet, welche Opioid-Peptide für welchen Opiatrezeptor gebildet werden. Wird Proenkephalin B beispielsweise nur zu Dynorphin<sub>1-17</sub> gespalten, entsteht ein Opioid-Peptid, das auf den Kappa-Rezeptor paßt. Wird dagegen Dynorphin<sub>1-17</sub> weiter zu Dynorphin<sub>1-8</sub> gespalten, so entsteht ein Peptid, das sowohl an den Kappa-, als auch an den Delta-Rezeptor bindet (Schulz et al., 1983). Erfolgt eine noch weitere Spaltung zu Leu-Enkephalin, so entsteht damit ein Delta-Rezeptor spezifisches Peptid.

Aufgrund ihrer unterschiedlichen Affinität zu verschiedenen Typen von Opiatrezeptoren haben verschiedene Opioid-Peptide und Opiate auch unterschiedliche biologische Wirkungen. Über einige durch die Besetzung von Kappa-Rezeptoren ausgelösten Wirkungen wird im folgenden noch zu sprechen sein.

#### 5.4. Regulation und mögliche physiologische Bedeutung von Dynorphin und $\alpha$ -Neo-Endorphin in der Hypophyse

Um Aufschluß über mögliche physiologische Funktionen von Opioid-Peptiden des Proenkephalin B-Systems in der Hypophyse zu erhalten, wurde die Modulation dieser Peptide im Vergleich zu anderen hypophysären (Opioid-) Peptiden und Hormonen untersucht.

Die vorgenommenen pharmakologischen bzw. endokrinologischen Manipulationen, wie Dehydratation, Dexamethasonbehandlung und Adrenalektomie führten im Hinterlappen der Hypophyse zu einer gleichsinnigen Veränderung der Gewebespiegel von ir-Dynorphin, ir- $\alpha$ -Neo-Endorphin, ir-Leu-Enkephalin und ir-Vasopressin. Auch andere pharmakologische Manipulationen, wie z.B. akute und chronische Behandlung der Ratten mit

Alkohol, Morphin oder Neuroleptika führten jeweils zu einer gleichsinnigen Veränderung der Gewebespiegel von ir-Dynorphin, ir- $\alpha$ -Neo-Endorphin und ir-Vasopressin im Hypophysenhinterlappen (Herz et al., 1982; Seizinger et al., 1983). Diese Befunde sind in Übereinstimmung mit immunohistochemischen Untersuchungen, die zeigen, daß ir-Dynorphin, ir- $\alpha$ -Neo-Endorphin und ir-Leu-Enkephalin innerhalb des Hypophysenhinterlappens in denselben Nervenfasern wie Vasopressin lokalisiert sind; diese Nervenfasern sind Teil des magnozellulären hypothalamo-hypophysären Systems, dessen Neurone vom Nucleus supraopticus und Nucleus paraventricularis des Hypothalamus aus in den Hypophysenhinterlappen projizieren (Watson et al., 1982; Weber et al., 1982a; Martin und Voigt, 1981). Die auffällige Parallelität in der Modulation und Lokalisation von Dynorphin und  $\alpha$ -Neo-Endorphin einerseits und Vasopressin andererseits ließ es zunächst nicht unmöglich erscheinen, daß Vasopressin und die Opioid-Peptide vom gleichen Vorläufermolekül abstammen, analog etwa zum gleichen Prohormon für  $\beta$ -Endorphin und ACTH. Bereits vor der Strukturklärung der Vorläuferpeptide für Dynorphin/ $\alpha$ -Neo-Endorphin (Kakidani et al., 1982) und für Vasopressin (Land et al., 1982) machten unsere Untersuchungen an Brattleboro-Ratten diese Theorie bereits sehr unwahrscheinlich (Höllt et al., 1981): Wie in der vorliegenden Studie dargelegt, besitzen homozygote Brattleboro-Ratten - ein Rattenstamm, der unfähig ist zur Synthese von Vasopressin und daher an einem hereditären chronischen zentralen Diabetes insipidus leidet - unveränderte Gewebespiegel der Opioid-Peptide Dynorphin,  $\alpha$ -Neo-Endorphin und Leu-Enkephalin.

Ir-Dynorphin und ir- $\alpha$ -Neo-Endorphin im Hinterlappen der Hypophyse werden jeweils unterschiedlich zum Hypophysenvorderlappen reguliert. Wie oben ausgeführt, enthalten Vorder-und Hinterlappen jeweils auch biochemisch unterschiedliche Formen von Dynorphin und  $\alpha$ -Neo-Endorphin-Immunoreaktivität.

Ir- $\beta$ -Endorphin ist in der Hypophyse im Vorderlappen und Mittellappen lokalisiert, kommt aber nicht wie Dynorphin und  $\alpha$ -Neo-Endorphin im Hinterlappen vor (Bloom et al., 1977). Wie die vorliegenden Untersuchungen weiter zeigten, ist die Regulation von ir- $\beta$ -Endorphin in beiden Lappen nicht nur unterschiedlich zu der von ir-Dynorphin/ir- $\alpha$ -Neo-Endorphin im Hinterlappen, sondern auch unterschiedlich zur Regulation der hochmolekularen Dynorphin- und  $\alpha$ -Neo-Endorphin-Formen im Hypophysenvorderlappen. Obwohl die genaue Lokalisation von ir-Dynorphin und ir- $\alpha$ -Neo-Endorphin im Vorderlappen noch nicht bekannt ist, weisen die Unterschiede in der Modulation darauf hin, daß diese beiden Betide des Proenkephalin B-Systems wahrscheinlich nicht in den  $\beta$ -Endorphin produzierenden Zellen des Vorderlappens synthetisiert werden.

Ein weiterer wichtiger Befund dieser Studie ist, daß offensichtlich auch Vasopressin und die Opioid-Peptide des Hypophysenhinterlappens durch Corticosteroidbehandlung beeinflusst werden können - und zwar gleichsinnig. Bilaterale Adrenalektomie führt zu einem starken Abfall der Gewebespiegel von ir-Vasopressin, ebenso wie von ir-Dynorphin, ir- $\alpha$ -Neo-Endorphin und ir-Leu-Enkephalin im Hypophysenhinterlappen, während Dexamethasonbehandlung die umgekehrte Wirkung zeigt. Interessanterweise haben Corticosteroide dagegen keinen Effekt auf das Proenkephalin B-System des Vorderlappens. Auf ir- $\beta$ -Endorphin und ir-ACTH im Vorderlappen zeigen Corticosteroide aber die entgegengesetzte Wirkung wie auf die Peptide des Hypophysenhinterlappens: Das Proopiomelanocortin-System des Vorderlappens antwortet auf Dexamethasonbehandlung mit einer starken Abnahme von Synthese, Gewebespiegel und Freisetzung von  $\beta$ -Endorphin und ACTH (Nakanishi et al., 1977; Roberts et al., 1979; die vorliegende Studie).

Opiate und Opioid-Peptide können die Freisetzung von Vasopressin und wahrscheinlich auch von Oxytocin aus dem

Hypophysenhinterlappen beeinflussen. So konnte gezeigt werden, daß die elektrisch stimulierte Freisetzung von Vasopressin aus isolierten Hypophysenhinterlappen durch Opioid-Peptide gehemmt wird (Iversen et al., 1980; Lightman et al., 1982). Die elektrisch stimulierte Freisetzung von Oxytocin aus isolierten Hypophysenhinterlappen ließ sich durch Zugabe des Opiatantagonisten Naloxon weiter steigern; die wahrscheinliche Erklärung dafür ist, daß endogene Opioid-Peptide, die zusammen mit Oxytocin an den Nervenendigungen des Hypophysenhinterlappens freigesetzt werden, ihrerseits die Freisetzung von Oxytocin hemmen (Bicknell und Leng, 1982).

Für die Regulation der Freisetzung von Vasopressin und Oxytocin aus dem Hypophysenhinterlappen kommen mehrere Opioid-Peptide aus verschiedenen hypophysären Opioid-Peptid-Systemen in Frage: (1)  $\beta$ -Endorphin aus dem Hypophysenmittel- und vorderlappen, das dort 500 bzw. 50-fach höhere Konzentrationen aufweist als alle anderen hypophysären Opioid-Peptid-Systeme; (2) Met-Enkephalin aus dem Hypophysenhinterlappen, das immunohistochemisch in oxytocinhaltigen Neuronen des hypothalamo-hypophysären Systems lokalisiert werden konnte (Martin und Voigt, 1981); (3) Opioid-Peptide des Proenkephalin B-Systems in Vasopressin-haltigen Neuronen des Hypophysenhinterlappens, wie Dynorphin,  $\alpha$ -Neo-Endorphin oder Rimorphin, und (4) Leu-Enkephalin des Hypophysenhinterlappens, das sowohl (zusammen mit Met-Enkephalin) aus dem Proenkephalin A-System, als auch aus dem Proenkephalin B-System stammen kann.

Einige Argumente sprechen dafür, daß zumindest für die Regulation der Freisetzung von Vasopressin Opioid-Peptide des Proenkephalin B-Systems eine entscheidende Rolle spielen. Obwohl  $\beta$ -Endorphin in der Hypophyse höher als alle anderen Opioid-Peptide konzentriert ist, ist es nicht im Hinterlappen zu finden (Bloom et al., 1977). Das im benachbarten Mittellappen vorkommende  $\beta$ -Endorphin ist zum allergrößten

Teil  $\alpha$ -N-acetyliert und damit opiat-inaktiv (Smyth et al., 1979; Seizinger und Höllt, 1980; 1982; Eipper und Mains, 1981). Darüber hinaus konnten wir auch zeigen, daß ein Teil von Leu-Enkephalin und der weitaus überwiegende Teil von Met-Enkephalin im Hypophysenhinterlappen in der  $\alpha$ -N-acetylierten, opiat-inaktiven Form vorliegt (Seizinger et al., 1981a; Seizinger, in Vorbereitung). Wie diese Studie darlegt, sind dagegen die Opioid-Peptide des Proenkephalin B-Systems nicht  $\alpha$ -N-acetyliert und können somit an die Opiatrezeptoren des Hinterlappens binden.

Obwohl eine Differenzierung der Opiatrezeptoren im Hypophysenhinterlappen (Simantov und Snyder, 1977) noch aussteht, spricht manches dafür, daß bei der Regulation der Freisetzung von Vasopressin Kappa-Opiatrezeptoren eine entscheidende Rolle spielen. Substanzen, die speziell an den Kapparezeptor binden (Kappa-Liganden), können nämlich die Urinsekretion von normal mit Flüssigkeit versorgten Ratten steigern; dieser Effekt wird wahrscheinlich über eine Abnahme der Freisetzung von Vasopressin (= Antidiuretisches Hormon) vermittelt (Slizgi und Ludens, 1982; Leander, 1983). Die Opioid-Peptide des Proenkephalin B-Systems - Dynorphin,  $\alpha$ -Neo-Endorphin und Rimorphin - sind die endogenen Liganden dieser Kappa-Rezeptoren und daher wahrscheinliche Kandidaten als endogene Regulatoren der Freisetzung von Vasopressin. Da sie in denselben Nervenfasern wie Vasopressin lokalisiert sind und jeweils zusammen mit diesem neurosekretorischen Hormon freigesetzt werden, bilden sie im Hypophysenhinterlappen wahrscheinlich ein lokales Kontrollsystem, das die überschießende Freisetzung von Vasopressin verhindern soll.

Über die physiologische Bedeutung der Opioide des Proenkephalin B-Systems im Vorderlappen der Hypophyse läßt sich im Augenblick nur spekulieren. Enjalbert und Mitarbeiter konnten demonstrieren, daß die von Dopamin gehemmte Freisetzung von Prolaktin aus isolierten Hypophysenvorder-

lappen durch Opiate und Opioid-Peptide aufgehoben werden kann. Naloxon antagonisiert diese Wirkung (Enjalbert et al., 1979). Darüber hinaus konnte vor kurzem gezeigt werden, daß Opioid-Peptide die Rezeptoren für das Gonadotropin-releasing-Hormon im Hypophysenvorderlappen modulieren, ein Effekt, der ebenfalls durch Naloxon aufhebbar war (Barkan et al., 1983). Es wäre denkbar, daß Opioid-Peptide des Proenkephalin B-Systems - ähnlich wie im Hypophysenhinterlappen - als lokales Kontrollsystem für die Freisetzung "klassischer" Hypophysenhormone, wie z.B. Prolaktin, Gonadotropine oder Wachstumshormon, dienen; eine genauere Zuordnung der Peptide des Proenkephalin B-Systems zu einem bestimmten Zelltyp und damit zu einem bestimmten Hormon ist aber bisher noch nicht gelungen.

Ein Teil der Opioid-Peptide des Proenkephalin B-Systems, nämlich Dynorphin und Rimorphin kommen im Vorderlappen ausschließlich in einer hochmolekularen Form vor (siehe oben). Die sehr lange Wirkungsdauer dieses 6 000 Dalton-Peptides am Opiatrezeptor (Seizinger, unveröffentlicht) läßt eine relativ hohe Stabilität gegenüber Degradationsenzymen vermuten, wodurch dieses Peptid als Hormon geeignet erscheint. Dennoch ist eine hormonelle Wirkung dieses Opioids auf periphere Zielorgane nach Ausschüttung in den peripheren Blutkreislauf eher unwahrscheinlich, da die Konzentrationen aller Opioid-Peptide des Proenkephalin B-Systems im Hypophysenvorderlappen (inclusive des 6 000 Dalton-Peptids) 500-1000-fach niedriger sind als die der "klassischen" Hypophysenhormone. Auch dies spricht mehr für eine lokale Regulationswirkung.

#### 5.5. Weitere mögliche physiologische Funktionen von Opioid-Peptiden des Proenkephalin B-Systems

Auf die mögliche Bedeutung von Opioid-Peptiden des Proenkephalin B-Systems als lokale Regulatoren der Freisetzung von Hypophysenhormonen, u.a. von Vasopressin, wurde bereits hingewiesen. Dynorphin ist darüber hinaus möglicherweise indirekt auch an der Regulation eines weiteren Hypophysenhormons, des Luteinisierten Hormons (LH) beteiligt, indem es

wahrscheinlich die Freisetzung von LHRH dem Releasing-Faktor von LH, im Hypothalamus hemmt (Schulz et al., 1981).

Opioid-Peptide des Proenkephalin B-Systems haben als endogene Liganden der Kappa-Opiatrezeptoren eventuell auch Bedeutung bei der hypothalamischen Regulation der Flüssigkeits- und Nahrungsaufnahme: Verabreichung von Kappa-Rezeptor-spezifischen Substanzen erhöht die Nahrungs- und Wasseraufnahme bei Ratten; dieser Effekt ist durch Kappa-Rezeptor-Antagonisten aufhebbar (Morley et al., 1982). Auf eine Beeinflussung des Wasserhaushaltes durch Opioid-Peptide des Proenkephalin B-Systems weist darüber hinaus auch die Regulation der Freisetzung des Antidiuretischen Hormons (Vasopressin) hin (siehe oben). Interessanterweise zeigten sogenannte "obese mice", ein Mäusestamm mit angeborener Fettsucht, besonders hohe Empfindlichkeit für Kappa-Rezeptor-spezifische Substanzen. In diesen "obese mice" läßt sich im Vergleich zu Kontrollmäusen dieselbe Steigerung der Wasser- und Nahrungsaufnahme bereits mit wesentlich geringeren Dosen dieser Kappa-Agonisten erzielen (Ferguson-Segall et al., 1982). Veränderungen der Kappa-Rezeptoren oder der Liganden dieser Rezeptoren mögen daher bei der Pathogenese der Adipositas eine Rolle spielen.

Die regionale Verteilung der Kappa-Rezeptoren kann eventuell weitere Hinweise auf mögliche biologische Funktionen der Proenkephalin B-Peptide liefern. Untersuchungen im Zentralnervensystem des Menschen zeigten eine hohe Dichte von Kappa-Rezeptoren u.a. in der Substantia nigra, sowie in der Substantia gelatinosa des Rückenmarks (Pfeiffer et al., 1982; Członkowski et al., 1983). Gerade in diesen beiden Arealen konnten auch besonders hohe Konzentrationen von ir-Dynorphin und ir- $\alpha$ -Neo-Endorphin nachgewiesen werden (Maysinger et al., 1982; Przewłocki et al., 1983a). Das in der Substantia nigra vorkommende ir-Dynorphin und ir- $\alpha$ -Neo-Endorphin ist in Neuronen des strio-nigralen Systems enthalten, deren Axone in die Substantia nigra projizieren (Weber et al., 1982a; Vincent et al., 1982). Substantia nigra und Striatum spielen in der Regulation der extrapyramidalen

Motorik eine Rolle. Opiate und Opioid-Peptide beeinflussen die extrapyramidale Motorik und können beispielsweise katonieartige Zustände hervorrufen (Walker et al., 1980; Friedman et al., 1981). Darüber hinaus bewirkt intracerebroventrikuläre Gabe von Dynorphin<sub>1-17</sub> an Ratten starke, langanhaltende Effekte auf die extrapyramidale Motorik. Diese Effekte von Dynorphin<sub>1-17</sub> werden nicht durch Opiatrezeptoren vermittelt, sondern offenbar durch ein weiteres biologisch aktives Zentrum von Dynorphin<sub>1-17</sub> (Walker et al., 1982). Peptide des Proenkephalin B-Systems sind somit möglicherweise über (Kappa-)Opiatrezeptoren und andere nicht-opiatartige Mechanismen an der Regulation der extrapyramidalen Motorik beteiligt.

Die Substantia gelatinosa des Rückenmarks ist eine Struktur, in der Opiode höchstwahrscheinlich die Weiterleitung von Schmerzimpulsen aus der Peripherie in das Gehirn modulieren (Duggan et al., 1977). Die dort gefundenen hohen Konzentrationen sowohl an Kappa-Rezeptoren, als auch an Opioid-Peptiden des Proenkephalin B-Systems machen wahrscheinlich, daß diese Opioid-Peptide hierbei eine Rolle spielen. Intracerebroventrikulär verabreicht zeigen fast alle Opioid-Peptide des Proenkephalin B-Systems nur eine sehr geringe analgetische Wirkung und unterscheiden sich darin von Opioid-Peptiden des Proenkephalin A-Systems und von  $\beta$ -Endorphin (Höllt et al., 1982b). Bei intrathecaler Injektion läßt sich für Dynorphin<sub>1-8</sub> eine durch Naloxon antagonisierbare analgetische Wirkung nachweisen (Przewłocki et al., 1983b).

Fast alle Opioid-Peptide des Proenkephalin B-Systems besitzen ausgesprochen hohe Opiataktivität am Längsmuskelpräparat des Meerschweinchendünndarms. Dynorphin<sub>1-17</sub> ist in diesem biologischen Testsystem sogar die wirksamste aller bisher bekannten opiatartigen Substanzen (Goldstein et al., 1979; Chavkin et al., 1982; Corbett et al., 1982; Schulz et al., 1983). Wie die vorliegende Untersuchung zeigt, sind gerade im Dünndarm die höchsten Konzentrationen von

ir-Dynorphin und ir- $\alpha$ -Neo-Endorphin innerhalb der Peripherie nachweisbar. Untersuchungen von Kromer et al. (1981) ergaben, daß die Freisetzung von ir-Dynorphin aus isoliertem Meerschweinchendünndarm durch Veränderungen der peristaltischen Aktivität des Darms (durch den physiologischen Reiz von intraluminalen Druckveränderungen) moduliert werden kann. Die Summe dieser Befunde macht eine Beteiligung von Opioid-Peptiden des Proenkephalin B-Systems (v.a. von Dynorphin) an der Regulation der Darmmotilität sehr wahrscheinlich.

## 6. ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegenden Untersuchungen beschäftigen sich mit der Charakterisierung eines neuen endogenen Opioid-Peptid-Systems, das sich aus verschiedenen Formen der Opioid-Peptide Dynorphin,  $\alpha$ -Neo-Endorphin und Rimorphin zusammensetzt. Diese 3 Peptide entstammen einem gemeinsamen Vorläufermolekül, dem Proenkephalin B (Kakidani et al., 1982).

Peptide des Proenkephalin B-Systems sind in der Ratte am höchsten in der Hypophyse, vor allem im Hinterlappen der Hypophyse konzentriert. Dehydrierung und Adrenalectomie führten zu einer Abnahme, Dexamethasonbehandlung zu einer Zunahme der Konzentration von Dynorphin,  $\alpha$ -Neo-Endorphin und Leu-Enkephalin im Hinterlappen. Diese Manipulationen führten zu einer gleichsinnigen Verminderung der Konzentration des neurosekretorischen Hormons Vasopressin im Hinterlappen. Die Regulation dieser Peptide des Hinterlappens unterschied sich aber von der Regulation von Dynorphin und  $\alpha$ -Neo-Endorphin im Vorderlappen der Hypophyse, sowie von der Regulation von hypophysärem  $\beta$ -Endorphin. Opioid-Peptide des Proenkephalin B-Systems des Hypophysenhinterlappens stellen wahrscheinlich ein lokales Kontrollsystem der Freisetzung von Vasopressin dar.

Außer in der Hypophyse sind Peptide des Proenkephalin B-Systems auch in den meisten Hirnarealen, im Rückenmark, im Gastrointestinaltrakt und in der Lunge nachweisbar.

Zu einer genaueren Charakterisierung verschiedener Opioid-Peptide des Proenkephalin B-Systems wurden immunologische Methoden mit chromatographischen Trennverfahren, enzymatischen Techniken und biologischen Tests kombiniert. Neben Dynorphin<sub>1-17</sub> konnte ein neues endogenes Opioid-Peptid, Dynorphin<sub>1-8</sub>, identifiziert werden. Dynorphin<sub>1-8</sub> ist im Gehirn bis zu 10-fach höher konzentriert als Dynorphin<sub>1-17</sub> und hat dort möglicherweise Neurotransmitter- oder Neuromodulatorfunktion.

Das Tridecapeptid Rimorphin konnte als natürlich vorkommendes Opioid-Peptid neuraler Gewebe nachgewiesen werden,

obwohl es - ebenso wie Dynorphin<sub>1-8</sub> - innerhalb der Sequenz des Vorläufermoleküls nicht von der typischen Spaltungssequenz zweier basischer Aminosäuren flankiert ist. Die meisten untersuchten Gewebe enthielten darüber hinaus zwei gemeinsame Vorläuferpeptide von Dynorphin und Rimorphin, nämlich Dynorphin<sub>1-32</sub> und ein noch größeres Peptid mit einem Molekulargewicht von etwa 6.000. Im Gegensatz zu allen anderen Strukturen war im Vorderlappen der Hypophyse nur dieses 6.000 Dalton-Peptid - nicht dagegen Dynorphin<sub>1-8</sub>, Dynorphin<sub>1-17</sub> oder Rimorphin - nachweisbar.

Nach der "klassischen" Spaltungstheorie müßte das Opioid-Dekapeptid  $\alpha$ -Neo-Endorphin nach seiner enzymatischen Freisetzung aus dem Vorläuferpeptid in das Opioid-Nonapeptid  $\beta$ -Neo-Endorphin weitergespalten werden. Jedoch waren in allen Hirnarealen die Konzentrationen von  $\alpha$ -Neo-Endorphin wesentlich höher - im Striatum und Thalamus bis zu 20-fach - als die von  $\beta$ -Neo-Endorphin.

Die höchst unterschiedliche Verteilung der verschiedenen Opioid-Peptide des Proenkephalin B-Systems in verschiedenen Strukturen läßt auf eine selektive, gewebespezifische Spaltung dieses Vorläufermoleküls schließen. Dabei erfolgt die enzymatische Spaltung von Proenkephalin B nicht (nur) an den typischen Spaltungssequenzen zweier basischer Aminosäuren. Dies ermöglicht die gezielte Freisetzung ganz bestimmter Opioid-Peptide aus einem Vorläufermolekül mit mehreren Opioid-Peptid-Sequenzen. Die dabei entstehenden Opioid-Peptide unterscheiden sich in ihrer Rezeptorselektivität und Stabilität; dies läßt auf unterschiedliche biologische Funktionen dieser Peptide schließen.

## 7. LITERATURVERZEICHNIS

- Barkan, A., Regiani, S., Duncan, J., Papavasiliou, S. and Marshall, J.C. (1983) Opioids modulate pituitary receptors for gonadotropin-releasing hormone. Endocrinology **112**, 387-389.
- Baumgarten, H.G., Björklund, A., Holstein, A.F. and Nobin, A. (1972) Organization and ultrastructural identification of the catecholamine nerve terminals in the neural lobe and pars intermedia of the rat pituitary. Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat. **126**, 483-491.
- Bicknell, R.J. and Leng, G. (1982) Endogenous opiates regulate oxytocin but not vasopressin secretion from the neurohypophysis. Nature **298**, 161-162.
- Bloom, F., Battenberg, E., Rossier, J., Ling, N., Leppaluoto, J., Vargo, T.M. and Guillemin, R. (1977) Endorphins are located in the intermediate and anterior lobes of the pituitary gland, not in the neurohypophysis. Life Sci. **20**, 43-48.
- Bloom, F., Battenberg, E., Rossier, J., Ling, N. and Guillemin, R. (1978) Neurons containing  $\beta$ -endorphin in rat brain exist separately from those containing enkephalin: immunocytochemical studies. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **75**, 1591-1595.
- Bradbury, A.F., Smyth, D.G., Snell, C.R., Birdsall, N.J.M. and Hulme, E.C. (1976) C-fragment of lipotropin has a high affinity for brain opiate receptors. Nature **260**, 793-795.
- Chang, K.-J., Huzam, E. and Cuatrecasas, P. (1981) Novel opiate binding sites selective for benzomorphan site. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **78**, 4141-4145.
- Chavkin, C., James, I.F. and Goldstein, A. (1982) Dynorphin is a specific endogenous ligand of the  $\kappa$ -opiate receptor. Science **215**, 413-415.

- Comb, M., Seeburg, P.H., Adelman, J., Eiden, L. and Herbert, E. (1982) Primary structure of the human Met- and Leu-enkephalin precursor and its m-RNA. Nature **295**, 663-664.
- Cone, R.J. and Goldstein, A. (1982) A specific radioimmunoassay for the opioid peptide dynorphin B in neural tissues. Neuropeptides **3**, 97-106.
- Corbett, A.D., Paterson, S.J., McKnight, A.T., Magnan, J. and Kosterlitz H.W. (1982) Dynorphin<sub>1-8</sub> and dynorphin<sub>1-9</sub> are ligands for the  $\kappa$ -subtype of opiate receptor. Nature **299**, 79-81.
- Crine, P., Gianoulakis, C., Seidah, N.G., Gossard, F., Pezalla, P.D., Lis, M. and Chrétien, M. (1978) Biosynthesis of  $\beta$ -endorphin from  $\beta$ -lipotropin and a larger molecular weight precursor in rat pars intermedia. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **75**, 4719-4723.
- Członkowski, A., Costa, T., Przewłocki, R., Pasi, A. and Herz, A. (1983) Opiate receptor binding sites in human spinal cord. Brain Res., in press.
- Dreifuss, J.J. (1975) A review on neurosecretory granules: Their contents and mechanisms of release. Annals N.J. Acad. Sci. **248**, 184-201.
- Duggan, A.W., Hall, J.G. and Headley, P.M. (1977) Suppression of transmission of nociceptive impulses by morphine: selective effects of morphine administered in the region of the substantia gelatinosa. Br. J. Pharmacol. **61**, 65-76.
- Duka, T., Höllt, V., Przewłocki, R. and Wesche D. (1978) Distribution of methionine- and leucine-enkephalin within the rat pituitary gland measured by highly specific radioimmunoassays. Biochem. biophys. Res. Commun. **85**, 1119-1127.
- Eipper, B.A. and Mains, R.E. (1978) Analysis of the common precursor to corticotropin and endorphin. J. Biol. Chem. **252**, 5732-5744.

- Eipper, B.A. and Mains, R.E. (1981) Further analysis of post-translational processing of  $\beta$ -endorphin in rat intermediate pituitary. J. Biol. Chem. **256**, 5689-5695.
- Enjalbert, A., Ruberg, M., Arancibia, S., Priam, M. and Kordon, C. (1979) Endogenous opiates block dopamine inhibition of prolactin secretion in vitro. Nature **280**, 595-597.
- Ey, P.L., Prowse, S.J. and Jensen, C.R. (1978) Isolation of pure Jg G<sub>1</sub>, Jg G<sub>2a</sub> and Jg G<sub>2b</sub> immunoglobulins from mouse serum using protein A-Sepharose. Immunochemistry **15**, 429-436.
- Ferguson-Segall, M., Flynn, J.J., Walker, J. and Margules, D.L. (1982) Increased immunoreactive dynorphin and leu-enkephalin in posterior pituitary of obese mice (*ob/ob*) and super-sensitivity to drugs that act at kappa receptors. Life Sci. **31**, 2233-2236.
- Fischli, W., Goldstein, A., Hunkapiller, M.W. and Hood, L.H. (1982) Isolation and amino acid sequence analysis of a 4,000-dalton dynorphin from porcine pituitary. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **79**, 5435-5437.
- Friedman, H.J., Jen, M.-F., Chang, J.K., Lee, N.M. and Loh, H.H. (1981) Dynorphin: A possible modulatory peptide on morphine or  $\beta$ -endorphin analgesia in mouse. Eur. J. Pharmacol. **69**, 357-361.
- Furutani, I., Morimoto, J., Shibahara, S., Noda, M., Takahashi, H., Hirose, T., Asai, M., Inayama, S., Hayashida, H., Miyata, T. and Numa, S. (1983) Cloning and sequence analysis of cDNA for ovine corticotropin-releasing factor precursor. Nature **301**, 537-540.
- Garren, L.D., Gill, G.N., Masui, H. and Walton, G.M. (1971) On the mechanism of action of ACTH. I. Stereogenesis. Recent Prog. Horm. Res. **27**, 433-474.
- Ghazarossian, V.E., Chavkin, Ch. and Goldstein, A. (1980) A specific radioimmunoassay for the novel opioid peptide dynorphin. Life Sci. **27**, 75-86

- Giraud, P. Lissitzky, I.C., Conte-Devolx, B., Gillioz, P. and Oliver, C. (1980) Influence of haloperidol on ACTH and  $\beta$ -endorphin in the rat. Eur. J. Pharmacol. **62**, 215-217.
- Glowinsky, J. and Iversen, L. (1966) Regional studies of catecholamines in the rat brain. I. Disposition of  $^3\text{H}$ -norepinephrine,  $^3\text{H}$ -dopamine and  $^3\text{H}$ -DOPA in various regions of the brain. J. Neurochem. **13**, 655-669.
- Goldstein, A., Tachibana, S., Lowney, L.I., Hunkapiller, M. and Hood, L. (1979) Dynorphin-(1-13), an extraordinarily potent opioid peptide. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **76**, 6666-6670.
- Goldstein, A., Fischli, W., Lowney, L.I., Hunkapiller, M. and Hood, L. (1981) Porcine pituitary dynorphin: Complete amino acid sequence of the biologically active heptadecapeptide. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **78**, 7219-7223.
- Gramsch, C., Kleber, G., Höllt, V., Pasi, A., Mehraein, P. and Herz, A. (1980) Pro-opiocortin fragments in human and rat brain:  $\beta$ -Endorphin and  $\alpha$ -MSH are the predominant peptides. Brain Res. **192**, 109-119.
- Gubler, U., Seeburg, P., Hoffman, B.J., Gage, L.P. and Udenfriend, S. (1982) Molecular cloning establishes proenkephalin as precursor of enkephalin-containing peptides. Nature **295**, 206-208.
- Guillemin, R., Ling, N. and Burgus, R. (1976) Endorphines, peptides, d'origine hypothalamique et neurohypophysaire à activité morphinomimétique. Isolement et structure moléculaire de l' $\alpha$ -endorphine. C. R. Acad. Sc. (Paris) **282**, 783-785.
- Hersh, L.P. and McKelvy, J.F. (1979) Enzymes involved in the degradation of thyrotropin releasing hormone (TRH) and luteinizing hormone releasing hormone (LH-RH) in bovine brain. Brain Res. **168**, 553-564.

- Herz, A., Höllt, V., Gramsch, Ch. and Seizinger, B.R. (1982) Differential distribution, release, and modulation of dynorphin and  $\beta$ -endorphin. In: Regulatory Peptides: From Molecular Biology to Function, eds. Costa, E., Trabucchi, M., Raven Press, New York, pp. 51-59.
- Höllt, V., Gramsch, Ch. and Herz, A. (1979) Immunoassay of  $\beta$ -endorphin. In: Radioimmunoassay of Drugs and Hormones in Cardiovascular Medicine, eds. Albertini, A., da Prada, M., Peskar, B.A., Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, pp. 293-307.
- Höllt, V., Haarmann, I., Seizinger, B.R. and Herz, A. (1981) Levels of dynorphin-(1-13) immunoreactivity in rat neurointermediate pituitaries are concomitantly altered with those of leucine-enkephalin and vasopressin in response to various endocrine manipulations. Neuroendocrinology **33**, 333-339.
- Höllt, V., Haarmann, I., Seizinger, B.R. and Herz, A. (1982a) Chronic haloperidol treatment increases the level of in vitro translatable messenger ribonucleic acid coding for the  $\beta$ -endorphin/adrenocorticotropin precursor proopiomelanocortin in the pars intermedia of the rat pituitary. Endocrinology **110**, 1885-1891.
- Höllt, V., Tulunay, F.C., Woo, S.K., Loh, H.H. and Herz, A. (1982b) Opioid-peptides derived from pro-enkephalin A but not that from pro-enkephalin B are substantial analgesics after administration into brain of mice. Eur. J. Pharmacol. **85**, 355-356.
- Hughes, J., Smith, T.W., Kosterlitz, H.W., Fothergill, L.A., Morgan, B.A. and Morris, H.R. (1975) Identification of two related pentapeptides from the brain with potent opiate agonist activity. Nature **258**, 577-579.
- Iversen, L.L., Iversen, S.D. and Bloom, F.E. (1980) Opiate receptors influence vasopressin release from nerve terminals in rat neurohypophysis. Nature **284**, 350-351.

- Jacobs, J.W., Goodman, R.H., Chin, W.W., Dee, P.C., Haber-  
rer, J.F., Bell, H.H. and Potts, J.T. (1981) Calcitonin  
messenger RNA encodes multiple polypeptides in a single  
precursor. Science **213**, 457-459.
- Kakidani, H., Furutani, J. Takahashi, H., Noda, M., Mori-  
moto, J., Hirose, T., Asai, M., Inayama, S., Nakanishi,  
S. and Numa, S. (1982) Cloning and sequence analysis of  
cDNA for porcine  $\beta$ -neo-endorphin/dynorphin precursor.  
Nature **298**, 245-249.
- Kangawa, K., Minamino, N., Chino, N., Sakokibara, S. and  
Matsuo, H. (1981) The complete amino acid sequence of  
 $\alpha$ -neo-endorphin. Biochem. biophys. Res. Commun. **99**,  
871-878.
- Kilpatrick, D.L., Takashi, T., Jones, B.N., Stern, A.S.,  
Shively, J.E., Hullihan, J., Kimura, S., Stein, S. and  
Udenfriend, S. (1981) A highly potent 3200-dalton adre-  
nal opioid peptide that contains both a [Met-] and  
[Leu] enkephalin sequence. Proc. Natl. Acad. Sci. USA  
**78**, 3265-3268.
- Kilpatrick, D.L., Wahlström, A., Lahm, H.W., Blacher, R.  
and Udenfriend, S. (1982) Rimorphin, a unique, natural-  
ly occurring [Leu]enkephalin-containing peptide found in  
association with dynorphin and  $\alpha$ -neo-endorphin. Proc.  
Natl. Acad. Sci. USA **79**, 6480-6483.
- Kromer, W., Höllt, V., Schmidt, H. and Herz, A. (1981)  
Release of immunoreactive-dynorphin from the isolated  
guinea-pig small intestine is reduced during peristal-  
tic activity. Neurosci. Lett. **25**, 53-56.
- Land, H., Schütz, G., Schmale, H. and Richter, D. (1982)  
Nucleotide sequence of cloned cDNA encoding bovine ar-  
ginine vasopressin-neurophysin II precursor. Nature **295**,  
299-303.
- Larsson, L.I., Childers, S. and Snyder, S.H. (1979) Met-  
and Leu-enkephalin immunoreactivity in separate neu-  
rones. Nature **282**, 407-410.

- Leander, J.D. (1983) A kappa opioid effect: Increased urination in the rat. J. Pharmacol. Exp. Ther. 224, 89-94.
- Li, C.H., Barnafi, L., Chrétien, M. and Chung, D. (1965) Isolation and amino-acid sequence of  $\beta$ -LPH from sheep pituitary glands. Nature 208, 1093-1094.
- Lightman, S.L., Iversen, L.J. and Forsling, M.L. (1982) Dopamine and [D-Ala<sup>2</sup>, D-Leu<sup>5</sup>]enkephalin inhibit the electrically stimulated neurohypophyseal release of vasopressin in vitro: evidence for calcium-dependent opiate-action. J. Neurosci. 2, 78-81.
- Ling, N., Burgus, R. and Guillemin, R. (1976) Isolation, primary structure and synthesis of  $\alpha$ -endorphin and  $\gamma$ -endorphin, two peptides of hypothalamic-hypophyseal origin with morphinomimetic activity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 3942-3946.
- Lord, J.A.H., Waterfield, A.A., Hughes, J. and Kosterlitz, H.W. (1977) Endogenous opiate peptides: multiple agonists and receptors. Nature 267, 495-499.
- Mains, R.E. and Eipper, B.A. (1979) Synthesis and secretion of corticotropins, melanotropins, and endorphins by rat intermediate pituitary cells. J. Biol. Chem. 254, 7885-7894.
- Mains, R.E., Eipper, B.A. and Ling, N. (1977) Common precursor to corticotropin and endorphins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 3014-3018.
- Martin, W.R., Eades, C.G., Thomson, J.A., Huppler, R.E. and Gilbert, P.E. (1976) The effect of morphine and nalorphine-like drugs in the nondependent and morphine-dependent chronic spinal dog. J. Pharmacol. Exp. Ther. 197, 517-532.
- Martin, R. and Voigt, K.H. (1981) Enkephalins co-exist with oxytocin and vasopressin in nerve terminals of rat neurohypophysis. Nature 289, 502-504.

- Maysinger, D., Höllt, V., Seizinger, B.R., Mehraein, P., Pasi, A. and Herz, A. (1982) Parallel distribution of immunoreactive  $\alpha$ -neo-endorphin and dynorphin in rat and human tissue. Neuropeptides 2, 211-225.
- Minamino, N., Kingawa, K., Fukuda, A. and Matsuo, H. (1980) A new opioid octapeptide related to dynorphin from porcine hypothalamus. Biochem. biophys. Res. Commun. 95, 1475-1481.
- Minamino, N., Kitamura, K., Hayashi, J., Kangawa, K. and Matsuo, H. (1981) Regional distribution of  $\alpha$ -neo-endorphin in rat brain and pituitary. Biochem. biophys. Res. Commun. 102, 226-234.
- Mizuno, K., Minamino, N., Kangawa, K. and Matsuo, H. (1980a) A new endogenous opioid peptide from bovine adrenal medulla: Isolation and amino acid sequence of a dodecapeptide (BAM-12P). Biochem. biophys. Res. Commun. 95, 1482-1488.
- Mizuno, K., Minamino, N., Kangawa, K. and Matsuo, H. (1980b) A new family of endogenous "big" met-enkephalins from bovine adrenal medulla: Purification and structure of docosa- (BAM-22P) and eicosapeptide (BAM-20P) with very potent opiate activity. Biochem. biophys. Res. Commun. 97, 1283-1290.
- Morley, J.E., Levine, A.S., Grace, M. and Knier, J. (1982) An investigation of the role of kappa opiate receptor agonists in the initiation of feeding. Life Sci. 31, 2617-2626.
- Mulder, A.H., van der Berg, W.B. and Stoff, J.C. (1975) Calcium-dependent release of radiolabelled catecholamines and serotonin from rat brain synaptosomes in a superfusion system. Brain Res. 99, 419-427.
- Nakanishi, S., Kita, T., Taii, S., Imura, H. and Numa, S. (1977) Glucocorticoid effect on the level of corticotropin messenger RNA activity in rat pituitary. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 3283-3286.

- Nakanishi, S., Inoue, A., Kita, T., Nakamura, M., Chang, A.C.Y., Cohen, S.N. and Numa, S. (1979) Nucleotide sequence of cloned cDNA for bovine corticotropin precursor. Nature **278**, 423-427.
- Noda, M., Furutani, Y., Takahashi, H., Toyosato, M., Hirose, T., Inayama, S., Nakanishi, S. and Numa, S. (1982) Cloning and sequence analysis of cDNA for bovine adrenal preproenkephalin. Nature **295**, 202-206.
- Pert, C.B. and Snyder, S.H. (1973) Opiate receptor: Demonstration in nervous tissue. Science **179**, 1011-1014.
- Pfeiffer, A., Pasi, A., Mehraein, P. and Herz, A. (1981) A subclassification of  $\kappa$ -sites in human brain by use of dynorphin<sub>1-17</sub>. Neuropeptides **21**, 88-97.
- Pfeiffer, A., Pasi, A., Mehraein, P. and Herz, A. (1982) Opiate receptor binding sites in human brain. Brain Res. **248**, 87-96.
- Przewłocki, R., Gramsch, C., Pasi, A. and Herz, A. (1983a) Characterization and localization of immunoreactive dynorphin,  $\alpha$ -neo-endorphin, met-enkephalin and substance P in human spinal cord. Brain Res., in press.
- Przewłocki, R., Shearman, G.T. and Herz, A. (1983b) Mixed opioid/nonopioid effects of dynorphin and dynorphin-related peptides after their intrathecal injection in rats. Neuropeptides **3**, 233-240.
- Roberts, J.L., Budarf, M.L., Baxter, J.D. and Herbert, E. (1979) Selective reduction of proadrenocorticotropin/endorphin messenger ribonucleic acid activity in mouse pituitary tumor cells by glucocorticoids. Biochemistry **18**, 4907-4915.
- Rossier, J.R., Vargo, T.M., Minick, S., Ling, N., Bloom, F.R. and Guillemin, R. (1977) Regional dissociation of  $\beta$ -endorphin and enkephalin contents in rat brain and pituitary. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **74**, 5126-5165.

- Rossier, J. Battenberg, E., Pittman, Q., Bayon, A., Koda, L., Miller, R., Guillemin, R. and Bloom, F.E. (1979) Hypothalamic enkephalin neurones may regulate the neurohypophysis. Nature 277, 653-655.
- Rossier, J. (1981) Enkephalin biosynthesis. The search for a common precursor. TINS, April, 94-97.
- Rossier, J. (1982) Opioid peptides have found their roots. Nature 298, 221-222.
- Schulz, R. and Goldstein, A. (1972) Inactivity of narcotic glucuronides as analgesics in hypothalamic extracts. Am. J. Physiol. 208, 293-296.
- Schulz, R., Wilhelm, A., Pirke, K.M., Gramsch, C. and Herz, A. (1981)  $\beta$ -Endorphin and dynorphin control serum luteinizing hormone levels in immature female rats. Nature 294, 737-759.
- Schulz, R., Wüster, M. and Herz, A. (1983) Endogenous ligands for  $\kappa$ -opiate receptors. Peptides, in press.
- Seizinger, B.R. and Höllt, V. (1980) In vitro biosynthesis and N-acetylation of  $\beta$ -endorphin in pars intermedia of the rat pituitary. Biochem. biophys. Res. Commun. 96, 535-543.
- Seizinger, B.R. and Höllt, V. (1982) In vitro studies of the biosynthesis and release of  $\alpha$ -N-acetyl- $\beta$ -endorphin from the intermediate lobe of the rat pituitary. In: Regulatory Peptides: From Molecular Biology to Function, eds. Costa, E., Trabucchi, M., Raven Press, New York, pp. 27-34.
- Seizinger, B.R., Höllt, V. and Herz, A. (1981a) Evidence for an opiate-inactive N-acetylated derivative of leu-enkephalin in the rat neurointermediate pituitary. Biochem. biophys. Res. Commun. 101, 289-297.
- Seizinger, B.R., Höllt, V. and Herz, A. (1981b) Evidence for the occurrence of the opioid octapeptide dynorphin-(1-8) in the neurointermediate pituitary of rats. Biochem. biophys. Res. Commun. 102, 197-205.

- Seizinger, B.R., Höllt, V. and Herz, A. (1981c) Immuno-reactive dynorphin in the rat adenohypophysis consists exclusively of 6000 dalton peptides. Biochem. biophys. Res. Commun. 103, 256-263.
- Seizinger, B.R., Höllt, V. and Herz, A. (1982a) Dynorphin-related opioid peptides in the intermediate pituitary of rats are not  $\alpha$ -N-acetylated. J. Neurochem. 39, 143-148.
- Seizinger, B.R., Maysinger, D., Höllt, V., Grimm, C. and Herz, A. (1982b) Concomitant neonatal development and in vitro release of dynorphin and  $\alpha$ -neo-endorphin. Life Sci. 31, 1757-1760.
- Seizinger, B.R., Bovermann, K., Maysinger, D., Höllt, V. and Herz, A. (1983) Differential effects of acute and chronic ethanol treatment on particular opioid peptide systems in discrete regions of rat brain and pituitary. Pharmacol. Biochem. Behav. 18, in press.
- Simantov, R. and Snyder, S.H. (1977) Opiate receptor binding in the pituitary gland. Brain Res. 124, 178-184.
- Simon, E.J., Hiller, J.M. and Edelman, J. (1973) Stereospecific binding of the potent narcotic analgesic  $^3\text{H}$ -etorphine to rat brain homogenate. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70, 1947-1949.
- Slizgi, G.R. and Ludens, J.H. (1982) Studies on the nature and mechanism of the diuretic activity of the opioid analgesic ethylketocyclazocine. J. Pharmacol. Exp. Ther. 220, 585-591.
- Smyth, D.G., Massey, D.E., Zakarian, S. and Finnie, M.D.A. (1979) Endorphins are stored in biologically active and inactive forms: isolation of  $\alpha$ -N-acetyl peptides. Nature 279, 252-254.
- Stein, A.S., Lewis, R.V., Kimura, S., Rossier, J., Gerber, L.D., Brink, L., Stein, S. and Udenfriend, S. (1979) Isolation of the opioid heptapeptide Met-enkephalin ( $\text{Arg}^6, \text{Phe}^7$ ) from bovine adrenal medullary granules and striatum. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 6680-6683.

- Steiner, D.F., Quinn, P.S., Chan, S.J., Marsh and Tager, H.S. (1980) Processing mechanisms in the biosynthesis of proteins. Ann. N.Y. Acad. Sci. 343, 1-16.
- Tachibana, S., Araki, K., Ohya, S. and Yoshida, S. (1982) Isolation and structure of dynorphin, an opioid peptide, from porcine duodenum. Nature 295, 339-340.
- Terenius, L. (1973) Stereospecific interaction between narcotic analgesics and a synaptic plasma membrane fraction of rat cerebral cortex. Acta pharmacol. (Kbh.) 33, 377-384.
- Usategui, R., Oliver, C., Vaudry, H., Lombardi, J., Rozenberg, J. and Mourre, A.M. (1976) Immunoreactive  $\alpha$ -MSH and ACTH levels in rat plasma and pituitary. Endocrinology 98, 189-196.
- Vincent, S., Hökfelt, T., Christensson, I. and Terenius, L. (1982) Immunohistochemical evidence for a dynorphin immunoreactive striato-nigral pathway. Eur. J. Pharmacol. 85, 251-252.
- Walker, J.M., Moises, H.C., Coy, D.H., Baldrighi, G. and Akil, H. (1982) Nonopiate effects of dynorphin and des-Tyr-dynorphin. Science 218, 1136-1138.
- Walker, J.M., Katz, R.J. and Akil, H. (1980) Behavioral effects of dynorphin<sub>1-13</sub> in the mouse and rat: Initial observations. Peptides 1, 341-345.
- Walter, R., Shlank, H., Glass, J.D., Schwartz, J.L. and Kerenyi, T.D. (1971) Leucylglycinamide released from oxytocin by human uterine enzyme. Science 173, 827-829.
- Watson, S.J., Akil, H., Richard III, C.W. and Barchas, J.D. (1978) Evidence for two separate opiate peptide neuronal systems. Nature 275, 226-228.
- Watson, S.J., Akil, H., Ghazarossian, V.E. and Goldstein, A. (1981) Dynorphin immunocytochemical localization in brain and peripheral nervous system: Preliminary studies. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 1260-1263.

- Watson, S.J., Akil, H., Fischli W., Goldstein, A., Zimmerman, E., Nilaver, G. and Van Wimersma Greidanus, T.B. (1982) Dynorphin and vasopressin: common localization in magnocellular neurones. Science 216, 85-87.
- Weber, E. and Barchas, J.D. (1983) Immunohistochemical distribution of dynorphin B in rat brain: Relation to dynorphin A and  $\alpha$ -neo-endorphin systems. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, in press.
- Weber, E., Evans, Ch.J., Chang, J.-K. and Barchas, J. (1981) Antibodies specific for  $\alpha$ -N-acetyl- $\beta$ -endorphins: Radioimmunoassays and detection of acetylated  $\beta$ -endorphins in pituitary extracts. J. Neurochem. 38, 436-447.
- Weber, E., Roth, K.A. and Barchas, J. (1982a) Immunohistochemical distribution of  $\alpha$ -neo-endorphin/dynorphin neuronal systems in the rat brain: Evidence for colocalization. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 3062-3066.
- Weber, E., Evans, Ch.J. and Barchas, J.D. (1982b) Predominance of the amino-terminal octapeptide fragment of dynorphin in rat brain regions. Nature 299, 77-79.
- Weber, E., Evans, Ch.J., Chang, J.-K. and Barchas, J.D. (1982c) Brain distributions of  $\alpha$ -neo-endorphin and  $\beta$ -neo-endorphin: Evidence for regional processing differences. Biochem. biophys. Res. Commun. 108, 81-88.
- Wüster, M., Schulz, R. and Herz, A. (1980) Opiate activity and receptor selectivity of dynorphin<sub>1-13</sub> and related peptides. Neurosci. Lett. 20, 79-83.
- Wüster, M., Schulz, R. and Herz, A. (1981) Multiple opiate receptors in peripheral tissue preparation. Biochem. Pharmacol. 30, 1883-1887.
- Yang, H.Y.T., Erdos, E.G. and Chiung, T.S. (1968) New enzymatic route for the inactivation of angiotensin. Nature 218, 1224-1226.
- Yoo, O.J., Powells, C.T. and Agarwal, K.L. (1982) Molecular cloning and nucleotide sequence of full-length cDNA coding for porcine gastrin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 1049-1053.

Zakarian, S. and Smyth, D.G. (1979) Distribution of active and inactive forms of endorphins in the rat pituitary and brain. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 5972-5976.



Ich möchte mich besonders bei Herrn Prof. Dr. Albert Herz und Herrn Priv.-Doz. Dr. Volker Höllt für ihre stete wissenschaftliche und menschliche Unterstützung bedanken.

Herzlichen Dank auch an Frau Cornelia Grimm und Frau Ingeborg Haarmann für ihre kompetente Mitarbeit.

Besonderen Dank auch an Frau Dr. Dusica Maysinger und Herrn Christoph Pittius für ihre Mithilfe.

Dank auch an Frau Heide Roth für die Erstellung des Manuskriptes und an Frau Ursula Bäuerle für die Anfertigung der Abbildungen.

Hanna und Nick Seibt ein besonders herzliches Dankeschön für ihre Freundschaft und emotionale Stabilisierung in streßgeplagten Zeiten.



## Lebenslauf Bernd Seizinger

27. Dezember 1956 geboren in München
- Vater: Georg August Seizinger, Konstrukteur
- Mutter: Mathilde Seizinger, geb. Haselbeck
- 1963 - 1967 Volksschule München
- 1967 - 1976 Asam-Gymnasium (mathematisch-naturwissenschaftlich), München-Giesing,  
Abitur Juli 1976 (Notendurchschnitt 1,1)
- 1976 Beginn des Studiums der Humanmedizin an  
der Ludwig-Maximilians-Universität München;
- seit 1976 Stipendium des Bayerischen Staates für besonders Begabte
- 1977 Zusätzliche Immatrikulation für Philosophie
- 1978 September Ärztliche Vorprüfung
- 1979 September 1. Teil des Medizinischen Staatsexamens
- 1979 Oktober Beginn der experimentellen Arbeit für die  
Promotion an der Neuropharmakologischen  
Abteilung des Max-Planck-Instituts für  
Psychiatrie, München
- 1982 März 2. Teil des Medizinischen Staatsexamens
- 1982 April Praktisches Jahr , 1. Tertial :  
bis 1983 März Psychiatrische Universitätsklinik, München,  
Nußbaumstraße; 2. Tertial: Medizinische  
Klinik II, Großhadern (Innere Medizin);  
3. Tertial: Neurochirurgische und  
Chirurgische Universitätsklinik, Großhadern.
- 1983 April/Juni 3. Teil des Medizinischen Staatsexamens
- 1983 Juni Approbation zum Arzt
- 1983 Verleihung der Otto-Hahn-Medaille  
(für wissenschaftliche Arbeiten über die  
Biosynthese und post-translationale  
Modifikation von Opioid-Peptiden)
- Seit April 1983 Forschungstipendium der Max-Planck-Gesellschaft  
(Abteilung Neuropharmakologie, Max Planck-  
Institut für Psychiatrie, Theoretisches Institut,  
München-Martinsried)









